

Die Biosynthese des Coniins

Ein Beitrag zur Biogenese der Alkaloide

Hans Günter Höss

DIE BIOSYNTHESE DES CONIINS
EIN BEITRAG ZUR BIOGENESE DER ALKALOIDE

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München



vorgelegt

von

Hans Günter Höss

aus

Stuttgart

Januar 1959

1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Butenandt
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Bamann

Tag der mündlichen Prüfung: 27. MAI 1959

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Butenandt in der Zeit von November 1956 bis Oktober 1958 im Max-Planck-Institut für Biochemie in München durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer,

Herrn Prof. Dr. Adolf Butenandt,

danke ich herzlich für das wohlwollende Interesse, das er meiner Arbeit entgegenbrachte.

Herrn Dr. Ulrich Schiedt (†) und Herrn Dr. Erich Hecker bin ich für die vielen Anregungen und Diskussionen sehr zu Dank verpflichtet.

Die Zeichnung des blühenden Schierlings verdanke ich Fräulein Boeckh-Behrens.

	Seite
I. Einleitung und Problemstellung	1
II. Die Biogenese des Coniins als Beispiel für die Bildung des Piperidinrings in <i>Conium maculatum</i> L.	5
A. Aufzucht der Schierlingspflanzen	5
B. Isolierung von Coniin aus Pflanzenmaterial	5
C. Quantitative Bestimmungen des Coniins in Pflanzenmaterial 1. Gravimetrische Bestimmung des Coniins in Pflanzenmate- rial	8
2. Mikrobestimmung des Coniins	8
3. Gehaltsbestimmungen an Schierling.	12
D. Nachweis freier Aminosäuren in <i>Conium maculatum</i>	13
E. Synthese der Pipecolinsäure	14
F. Fütterungsversuche	16
1. Applikationstechnik	16
2. Fütterungsversuche mit L-Lysin-dihydrochlorid	16
3. Fütterungsversuche mit L-Lysin- ¹⁴ C · 2 HCl	17
1. Injektionsversuch mit L-Lysin- ¹⁴ C	17
2. Injektionsversuch mit L-Lysin- ¹⁴ C	18
3. Injektionsversuch mit L-Lysin- ¹⁴ C	19
G. Zum Mechanismus der Biosynthese des Coniins	21
III. Versuche	23
IV. Zusammenfassung	41
Anhang: Abbildungen 1-12	

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die Bearbeitung der Frage, wie Alkaloide in der lebenden Pflanzenzelle synthetisiert werden, begann mit R. ROBINSONs Synthese des Tropinons ¹ unter milden Bedingungen. Aus den Ergebnissen dieser Arbeiten schloss er, dass sich die Alkaloide in vivo aus Aminosäuren bilden. Nach ihren möglichen Aminosäure-Vorstufen teilt er die Alkaloide in fünf Gruppen ein ²:

1. Phenylalanin-Gruppe, 2. Tryptophan-Tryptamin-Gruppe, 3. Tryptophan-Anthranilsäure-Gruppe, 4. Ornithin-Lysin-Gruppe und 5. Histidin-Gruppe.

C. SCHÖPF verbesserte ROBINSONs Tropinon-Synthese und arbeitete eine grosse Anzahl von Alkaloid-Synthesen aus ³, an denen Verbindungen beteiligt sind, die drei Strukturelemente enthalten: Eine basische Stickstoff-Funktion, eine Aldehydgruppe und eine C-H aktive Verbindung. Diese als „Mannich-Reaktionen“ aufzufassenden Kondensationen führen bei pH 3-9 und 20⁰-25⁰ C zu Alkaloiden. Als Ausgangsstoffe werden Substanzen eingesetzt, die in der Zelle vorkommen können. C. SCHÖPF nennt diese Synthesen, die in vitro ohne Gegenwart von Fermenten ablaufen, „Alkaloid-Synthesen unter zellmöglichen Bedingungen“.

So zeigte C. SCHÖPF am Beispiel der weit verbreiteten Lysin-Ornithin-Gruppe einen Weg für die zellmögliche Synthese des Pyridin- und Piperidinrings auf. Als Ausgangsmaterial dienen die cyclischen Schiffischen Basen Δ^1 -Piperidein (III) bzw. Δ^1 -Pyrrolin (IV), in der Annahme, dass diese in der Pflanze aus Lysin (I) bzw. Ornithin (II) nach oxydativer Desaminierung und Decarboxylierung gebildet werden ⁴.

1) R. ROBINSON, J. chem. Soc. (London) 111, 762 u. 876 (1917)

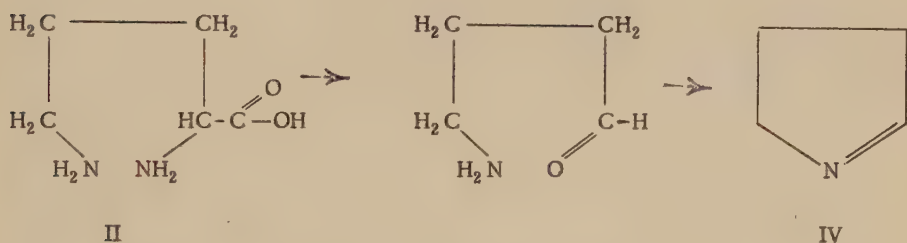
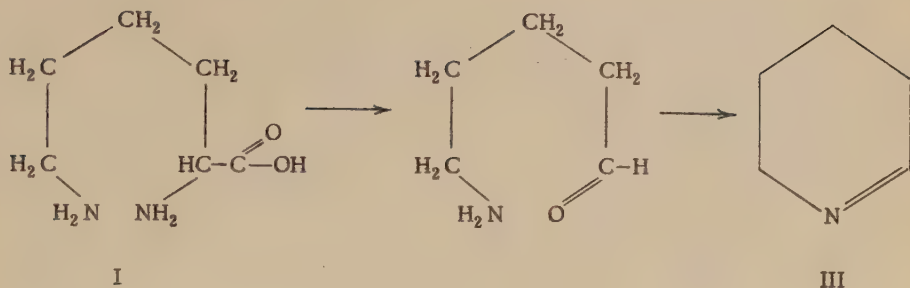
2) R. ROBINSON, Struct. Relations of Natur. Products, Oxford Uni. Press, London 1955

3) C. SCHÖPF, Angew. Chem. 50, 779, 797 (1937); 59, 29, 174 (1947);
61, 31 (1949)

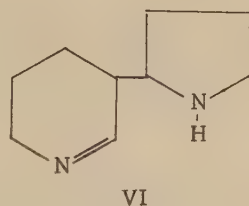
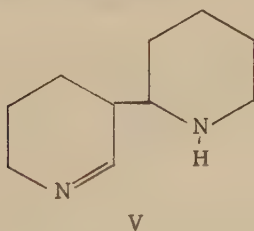
C. SCHÖPF, u. Th. KAUFFMANN, Liebigs Ann. Chem. 608, 88 (1957)

4) C. SCHÖPF, A. KOMZAK, F. BRAUN u. E. JAKOBI, Liebigs Ann. Chem. 559, 1 (1948)

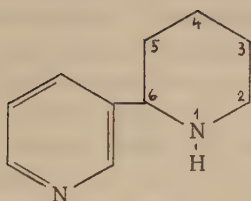




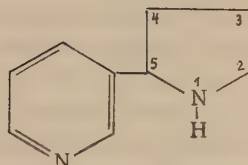
Aus III entsteht bei Änderung des pH-Wertes spontan das Dimere V, bzw. aus IV und III das Dimere VI.



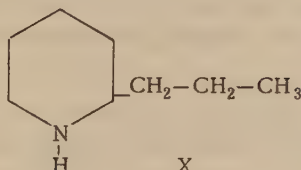
V und VI lassen sich dehydrieren, und es entstehen das Anabasin (Pyridin-3-piperidin(6) VII), ein Alkaloid aus *Anabasis aphylla* und Normikotin (VIII), ein Alkaloid aus *Nicotiana tabacum*, das als Vorstufe des Nikotins (IX) gilt ⁵.



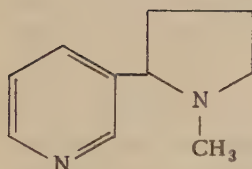
VII



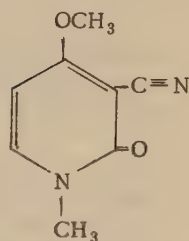
VIII



X



IX



XI

Danach sollte die Pflanze sowohl den Pyridinring des Nikotins (IX) und Anabasins (VII), als auch den Piperidinring des Anabasins aus Lysin bilden können.

Der methodische Fortschritt durch die Anwendung der Isotopentechnik ermöglicht es heute, die Vorstellungen über die Biosynthese der Alkaloide in der Pflanze zu überprüfen. Es zeigte sich, dass die bestehenden Hypothesen teilweise revidiert werden mussten.

So fand E. LEETE ⁶, dass Lysin-2-¹⁴C weder in den Pyridinring des Nikotins (IX) noch in den des Anabasins (VII) eingebaut wird. Vielmehr konnte R. F. DAWSON u. M. ⁷ zeigen, dass im Ring markierte Nikotinsäure die Vorstufe des Pyridinrings in Nikotin ist. Der Pyrrolidinring des Nikotins stammt dagegen vom Ornithin, wie mit Ornithin-2-¹⁴C gezeigt werden konnte ⁸, und Lysin-2-¹⁴C ist die Vorstufe des Piperidinrings des Anabasins ⁶.

6) E. LEETE, J. Amer. chem. Soc. 78, 3520 (1956)

7) R. F. DAWSON, D. R. CRISTMAN, A. F. D'ADAMO, M. L. SOLT u. A. P. WOLF, J. Amer. chem. Soc. 78, 2645 (1956)

8) E. LEETE u. K. J. SIEGFRIED, J. Amer. chem. Soc. 79, 4529 (1957)

Die Natur bedient sich also - zumindest bei den zitierten Beispielen - eines anderen Syntheseprinzips, als es durch die In-Vitro-Versuche unter „zellmöglichen Bedingungen“ - nahegelegt wird, und es erhebt sich die Frage, wie weit die für Anabasin und Nikotin gültigen Befunde verallgemeinerungsfähig sind. Einen weiteren Hinweis, dass der Pyridinring von Alkaloiden aus der Nikotinsäure stammt, geben Versuche von E. LEETE⁹ an Rizinuspflanzen, die wahrscheinlich machen, dass das Carboxyl-C der Nikotinsäure in der Nitrilgruppe des Rizinins (XI) wiedergefunden wird. Im Hinblick auf die Biosynthese des Piperidinrings von Alkaloiden verallgemeinert R. ROBINSON¹⁰: „The piperidine alkaloids may be interpreted as a C₅-unit (Lysin or equi.) combined terminally with a C₃-unit (acetone or equi.)“. Weitere experimentelle Beispiele sind jedoch nicht bekannt geworden.

Für Untersuchungen über die Biosynthese des Piperidinrings in Pflanzen bietet sich als einfachstes Alkaloid das Coniin (X) an, das als Hauptalkaloid im gefleckten Schierling (*Conium maculatum*) vorkommt,

Es ist das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Biosynthese des Coniins in vivo zu untersuchen. Da die wirkungsvolle Applikation von möglichen Vorstufen die Kenntnis des Alkaloidspiegels voraussetzt, werden im ersten Teil der Arbeit geeignete Bestimmungsmethoden ausgearbeitet. Im zweiten Teil werden Fütterungsversuche mit unmarkierten und radioaktiven Vorstufen beschrieben.

9) E. LEETE u. F. H. B. LEITZ, Chem. and Ind. 48, 1572 (1957)

10) R. ROBINSON, Struct. Relations of Natur. Products, Oxford Uni. Press, London (1955) S. 64

II. DIE BIOGENESE DES CONIINS ALS BEISPIEL FÜR DIE BILDUNG DES PIPERIDINRINGS IN CONIUM MACULATUM L.

A. Aufzucht der Schierlingspflanzen

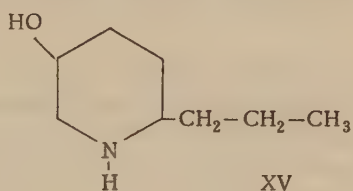
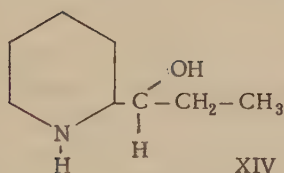
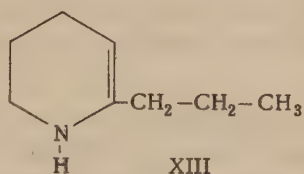
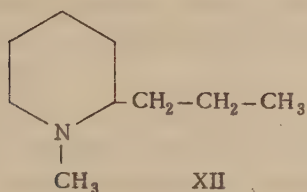
Der gefleckte Schierling, *Conium maculatum* L., ist ein einheimischer zweijähriger Doldenblütler. Man zieht die Pflanzen am besten aus den Früchten in Saatkästen und setzt die 4-6 Wochen alten Pflanzen bei warmer Witterung ins Freie. Dort ist der Schierling anspruchslos und wenig anfällig gegen Schädlinge. Zu Beginn des Winters überdeckt man die Blattrosette der einjährigen Pflanzen mit Reisig, um Kälteschäden zu vermeiden. Im darauffolgenden Jahr bildet der Schierling einen 2-3 m hohen Stengel und blüht von Anfang Juli bis Mitte September. Zur Blütezeit können ihn Blattläuse befallen, die sofort mit Malathion (Merck) o. ä. zu bekämpfen sind, da sonst ein vollständiger Fruchtansatz nicht zu erzielen ist. Bei einer grossen Gruppe blühender Pflanzen, wurde die interessante Beobachtung gemacht, dass - trotz Nähe eines Bienenstockes - vorwiegend Fliegen und andere Insekten, die durch Aasgeruch angelockt werden, die Blüten bestäuben. Die zarten Blüten (nicht - wie häufig angegeben - die ganze Pflanze) riechen deutlich nach Coniin, das einen dem Acetamid ähnlichen Geruch nach Mäuseurin aufweist. Das Coniin könnte zur Anlockung von Aasinsekten dienen und so eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Art spielen.

Werden die Pflanzen im Gewächshaus gehalten, so treiben sie lange Blattstiele und dünne, dafür aber grössere Blattspreiten. Über Winter kann man den Schierling nur unter Schwierigkeiten im Gewächshaus kultivieren. Er benötigt niedrige Temperaturen (15°-17°) und Frischluft. Auch ist für ausreichende Feuchtigkeit zu sorgen. Zentralheizung schädigt die Pflanzen stark und fördert den Schädlingsbefall (Nematoden und Rote Spinne). Die Pflanzen blühen im zweiten Jahr nur, wenn sie ins Freie gesetzt werden. Für Fütterungsversuche benutzt man am besten Gewächshauspflanzen im Sommer, topft sie kurz vor Versuchsbeginn in grössere Töpfe um und reduziert die Blattzahl nach Belieben.

B. Isolierung von Coniin aus Pflanzenmaterial

D-Coniin ist das Hauptalkaloid des gefleckten Schierlings. Als Nebenalkaloide kommen vor: L-Coniin, N-Methyl-D-Coniin, N-Methyl-L-Coniin (XII), Conicein (XIII), Conhydrin (XIV) und Pseudoconhydrin (XV). Der Gehalt an Nebenalkaloiden schwankt stark und ist je nach Standort verschieden. So kann

es vorkommen, dass Conicein (XIII) als Hauptalkaloid auftritt (bis 75% der Gesamtalkaloide), was auch zu seiner Auffindung geführt hat ¹¹.



Eine Trennung von Conicein und Coniin erreichte R. WOLFFENSTEIN ^{11,12}. Die vollkommene Trennung aller Alkaloide arbeitete J. v. BRAUN aus ¹³.

Zur Gewinnung von Coniin aus Pflanzenmaterial eignen sich am besten die unreifen grünen Früchte.

In Vorversuchen wurden einige Methoden der Literatur nachgearbeitet.

Nach F. CHEMNITZIUS ¹⁴ wird das alkalisierte Pflanzenmaterial unter Druck mit Äther ausgezogen. Der Äther wird mit wässriger Säure versetzt und abdestilliert. Nach Abtrennung der Fettschicht werden die wässrigen Lösungen gesammelt, alkalisch gemacht und wieder mit Äther extrahiert. Die Ätherphase wird eingengt und die Alkaloide werden fraktioniert destilliert.

Diese Methode erwies sich als zu verlustreich. Ein Eindampfen des Ätherextraktes ist bei der Flüchtigkeit der freien Alkaloide nicht günstig.

In Anlehnung an die F. GRAFschen Alkaloidbestimmungen ¹⁵ in Pflanzenmaterial wurden wechselnde Mengen eines Handelsextraktes aus Conium macu-

11) R. WOLFFENSTEIN, Ber. dtsch. chem. Ges. 28, 302 (1895)

12) R. WOLFFENSTEIN, Ber. dtsch. chem. Ges. 27, 2611 (1894)

13) J. v. BRAUN, Ber. dtsch. chem. Ges. 38, 3108 (1905)

14) F. CHEMNITZIUS, J. prakt. Chem. (2) 118, 2508 (1928)

15) F. GRAF, Dtsch. Apotheker-Ztg. 91, 797 (1951)

latum (angegebener Gehalt 0.56% Gesamtalkaloide) scharf getrocknet, dann mit Kalilauge versetzt und rasch mit Aluminiumoxyd zur Trockne verrieben. Das so erhaltene Pulver wurde trocken in eine Chromatographiesäule gefüllt und mit Chloroform eluiert. Danach wurde der Chloroformextrakt mit Salzsäure versetzt und zur Trockene gebracht. Man erhielt jedoch nur geringe Spuren eines braunen Produktes.

B. SCHORM ¹⁶ unterwirft die mit Alkali behandelten Schierlingsfrüchte einer Wasserdampfdestillation. Nach Zusatz von Salzsäure wird das Destillat eingengt, der Trockenrückstand auf dem Sandbad zur Zerstörung von Harzen erhitzt und aus Wasser umkristallisiert. Man erhält zwar Coniin, hat aber grosse Verluste durch das Erhitzen im Sandbad. Auch ist die starke Schaumentwicklung bei der Wasserdampfdestillation lästig.

Durch Zusatz von Silikonöl kann das Schäumen weitgehend verhindert werden. Als nachteilig erweist sich jedoch das Übertreten von Silikonöl in die Vorlage und in die Kristalle. Mit n-Oktanol kann die Schaumbildung ebenfalls unterdrückt werden. Es lässt sich aus dem angesäuerten Destillat mit Petroläther ohne Verluste an Coniinhydrochlorid ausschütteln. Der nach dem Eindampfen der wässrigen Phase verbleibende Rückstand enthält das Alkaloid neben der 10-100fachen Menge von Ammonsalzen. Zur Abtrennung kann die leichte Löslichkeit des Coniinhydrochlorids und die Schwerlöslichkeit der Ammonsalze in Chloroform ausgenützt werden.

Als beste Methode zur Isolierung von Coniin aus Pflanzenmaterial (Versuch Nr. 1) erwies sich, die Pflanzenteile mit Alkali zu behandeln und nach Zusatz von n-Oktanol Wasserdampf durchzuleiten. Das salzsaure vom Oktanol befreite Destillat wird im Vakuum eingengt und scharf getrocknet. Danach wird der Rückstand mit absolutem Chloroform ausgezogen, die Chloroformlösung filtriert und im Vakuum zur Trockne gebracht. Die Kristalle werden am Rückflusskühler mit absolutem Aceton extrahiert. Zur Kristallisation engt man das Aceton ein und erhält reines Coniinhydrochlorid.

Nach einigen Abänderungen lässt sich dieses Verfahren auch zur quantitativen gravimetrischen Bestimmung des Coniins benützen.

16) B. SCHORM, Ber. dtsch. chem. Ges. 14, 1766 (1881)

C. Quantitative Bestimmung des Coniins in Pflanzenmaterial

1. Gravimetrische Bestimmung des Coniins in Pflanzenmaterial.

Zunächst wurde versucht, in der vorstehend geschilderten Methode die Wasserdampfdestillation durch die schonendere Extraktion am Soxhlet zu ersetzen. Man erhält jedoch bei weit höherem Aufwand an Zeit und Lösungsmitteln keine besseren Ausbeuten an Coniin.

Auch die Reinigung des Chloroformextraktes mit Hilfe von Aluminiumoxyd (basisch oder neutral) hatte keinen positiven Effekt, da das Alkaloid nur mit Chloroform eluierbar ist, und der Schmelzpunkt eines unscharf schmelzenden Coniinhydrochlorids sich durch die Chromatographie nicht verändert.

Zur quantitativen gravimetrischen Bestimmung von Coniin in Pflanzen (Versuch Nr. 2) hat sich am besten erwiesen, die geernteten Pflanzenteile bei höchstens 60° zu trocknen und danach grob zu pulvern. Dieses Material wird eine Stunde gewässert, dann alkalisiert und mit n-Oktanol versetzt. Nach einer Wasserdampfdestillation wird die salzsaure Vorlage mit Petroläther vom Oktanol befreit. Durch mehrmaliges Ausziehen des Trockenrückstands der wässrigen Phase mit absolutem Chloroform entfernt man praktisch alle Ammonsalze und filtriert ab. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wird der Rückstand aus absolutem Aceton umkristallisiert. Man erhält razemisches Coniinhydrochlorid, während sich in den Mutterlaugen Coniceinhydrochlorid neben anderen Begleitstoffen anreichert.

Um die Genauigkeit der Methode zu überprüfen, wurde ein gut gemischtes einheitliches Blattpulver halbiert, ein Teil mit einer abgewogenen Menge Coniinhydrochlorid versetzt und beide Hälften getrennt obiger Methode unterworfen. Es konnten 93-97% des zugesetzten Alkaloids wiedergewonnen werden (Versuch Nr. 3).

Auf Grund der guten Ausbeuten wird dieses Verfahren zur Isolierung radioaktiven Coniins benutzt.

Zur Untersuchung des Alkaloidgehaltes einzelner Blätter (0.2-0.3 g Trockensubstanz) und kleinerer Pflanzen ist die Ausarbeitung einer Coniin-Mikrobestimmung erforderlich, die in 0.1 g Trockenpulver noch mit ausreichender Genauigkeit den Coniingehalt feststellen lässt.

2. Mikrobestimmung des Coniins.

Die Gesamtalkaloidbestimmung nach E. H. FARR und R. WRIGHT¹⁷ konnte nicht zur Ermittlung des Coniingehaltes Verwendung finden, da für einen Versuch 10 g Pflanzenpulver benötigt werden.

17) E. H. FARR u. R. WRIGHT, Pharmac. J. IV, 1, 89 (1895); 18, 185 (1904)

F. MELZER ¹⁸, A. DILLING ¹⁹, E. GABUTTI ²⁰ und J. A. SANCHEZ ²¹ arbeiteten verschiedene kolorimetrische Tests für Coniin und seine Nebenalkaloide aus. Eigene Versuche zeigten, dass die gebildeten Farbstoffe für eine quantitative Bestimmung, besonders in Gegenwart von Ammonsalzen, nicht lange genug stabil bleiben. Versuche mit Alkaloidfällungsmitteln wie wässrige und alkoholische Picrinsäure, alkoholische Picrolonsäure und wässrige Reineckesalzlösung ergaben bei geringen Coniinhydrochloridmengen keine sichtbare Fällung; dagegen fällt Silicowolframsäure und noch besser Phosphorwolframsäure das Alkaloid aus. Da aber Ammonsalze ebenso mitfallen, ist der Reinigungseffekt gering und das Verfahren für die Anwendung zur Alkaloid-Mikrobestimmung ungeeignet.

Coniin besitzt einen hohen Dampfdruck; er ist mit dem des Ammoniaks vergleichbar. Es lag nahe, die Methode der Ammoniakbestimmung auf Coniin zu übertragen.

F. J. CONWAY ²² benützte für Mikrokjeldahlbestimmungen ein nach ihm benanntes Porzellanschälchen mit ebenem Boden, das im Innern einen kreisrunden Wall enthält. Man gibt zur Bestimmung in die äussere Umrandung eine abgewogene Menge Ammonsalz auf die eine Seite und Natronlauge auf die andere. In den inneren Wall lässt man als Vorlage eine abgemessene Menge Säure samt Indikator einfließen, verschliesst das CONWAYschälchen, das oben plan geschliffen ist, mit einer Glasplatte und kippt vorsichtig, so dass die Natronlauge zum Ammonsalz fließen kann. Nach einiger Zeit wird geöffnet und die nicht verbrauchte Säure im inneren Schälchen zurücktitriert.

Die Versuche, das Verfahren von CONWAY auf die Coniin-Mikrobestimmung anzuwenden (Versuch Nr. 4), zeigten jedoch, dass bei Einwaagen von 4-6 mg das Coniin [nach 30 Stunden] nicht vollständig in die Vorlage übergegangen war. Um die Zeit abzukürzen, musste erwärmt werden, was sich mit diesen CONWAYschälchen nicht ausführen liess, da die Glasplatte dann nicht mehr dicht abschloss.

Ersetzt man die Porzellanschale durch einen kleineren Rundkolben mit weitem Schliff und Stopfen, so treten auch beim Erwärmen auf 60° keine Verluste ein (Versuch Nr. 5).

18) F. MELZER, Z. analyt. Chem. 37, 453 (1898); 41, 327 (1902)

19) A. DILLING, Pharmac. J. IV, 29, 34 und 70 (1909)

20) E. GABUTTI, Boll. chim. farmac. 45, 289 (1906); zit. C. II, 74 (1906)

21) J. A. SANCHEZ, Ber. ges. Physiol. exp. Pharmakol. 8, 18 (1921)

22) F. J. CONWAY u. A. BYRNE, Biochem. J. 27, 419 (1933)

Man füllt das abgewogene Coniinhydrochlorid in einen Kolben, gibt Natronlauge zu, stellt sofort einen Mikroerlenmeyer mit einer abgemessenen Menge Säure in den Kolben und verschliesst den Rundkolben mit dem Stopfen, der von zwei Federn festgehalten wird. Nach 16 Stunden gehen bei Einwaagen von 0.5 - 5 mg Coniinhydrochlorid 96-105% über.

Da im Schierlingsblattpulver und in Arzneimittelmischungen neben Coniin organische und anorganische Stoffe vorhanden sein können, die Ammoniak entwickeln, bzw. als Amine gleich flüchtig sind wie Coniin, musste eine Methode gefunden werden, bei der nur Coniin übergeht.

Versuche mit verschiedenen Aldehyden als Ammoniakfänger zeigten, dass sich Formaldehyd am besten bewährt. Bei bestimmten Konzentrationen von Formaldehyd und Natronlauge geht von 20 mg Ammonchlorid während 4-18 Stunden (20° und 60°) nichts in die Vorlage über (Versuch Nr. 6).

Fügt man dem obigen Versuchsansatz Coniinhydrochlorid zu, so ist nach 6-18 Stunden (je nach Einwaage) das gesamte Coniin übergegangen (Versuch Nr. 7).

Diese Methode eignet sich zur Coniin-Mikrobestimmung in Arzneimittelmischungen, jedoch zeigten weitere Versuche, dass sich diese Coniinbestimmung auf Pflanzenpulver nicht übertragen lässt.

Mehrere Versuchsreihen mit homogenem Schierlingsblattpulver zeigten beim Auftragen der Anzahl ml verbrauchter Säure gegen die zum Austreiben der Base erforderlichen Zeit, dass nach etwa 11-12 Stunden ein erstes Plateau erreicht wird. Die Menge der übergegangenen Base nimmt aber nach 17-18 Stunden wieder zu, um später (21-22 Stunden) erneut zu einem dritten, über 10 Stunden konstanten Wert anzusteigen (Abb. 1, Versuch Nr. 8). (Abbildungen siehe Anhang)

Setzt man dem Blattpulver Coniinhydrochlorid zu, so kann es nicht vollständig wiedergewonnen werden (Abb. 2: Kurve 1 und 2; Versuch Nr. 9).

Da auch der Zusatz von Graspulver ein 100proz. Übertreten von Coniin in die Säure verhindert (Abb. 2: Kurve 3; Versuch Nr. 10), lag der Schluss nahe, dass das Pflanzenmaterial Coniin zurückhält. Um dies auszuschliessen, wurde vor die beschriebene Mikrobestimmung eine Wasserdampfdestillation - ähnlich wie bei der gravimetrischen Coniinbestimmung - des Pflanzenpulvers eingeschoben. Führt man das Destillat in den Schliffkolben über, dunstet bis zur Trockne ein und unterwirft es dann der Mikrobestimmung, so erhält man für ein homogenes Blattpulver, einmal mit 1.0 mg Coniinhydrochlorid Zuwaage und das andere Mal ohne Zusatz, Kurven, die anzeigen, dass alles eingesetzte Coniin von der Säure aufgefangen wird (Abb. 3, Versuch Nr. 11). Beim Versuch ohne Coniinzusatz sind nach 9 Stunden alle flüchtigen Stoffe übergegangen; der Wert bleibt konstant

(untersucht bis 30 Stunden), während bei dem Versuch unter Zusatz von Coniin das Plateau nach 12 Stunden auftritt.

Da die Nebenalkaloide und biogenen Amine unter diesen Bedingungen auch flüchtig sind, musste die Flüchtigkeitskurve des reinen Coniins unter den gewählten Bedingungen bestimmt werden, wobei die eingesetzte Coniinmenge variiert wurde (Abb. 12, Versuch Nr. 12). Ein Zusatz von Ammonchlorid beschleunigt das Erreichen des Plateaus, wie man beim Vergleich von Abb. 4 mit Abb. 12 erkennt. Dies kann als „Verdrängungseffekt“ gedeutet werden (Versuch Nr. 13).

Die drei Punkte, bei denen zum ersten Mal der theoretische Wert erreicht wird, liegen auf einer Geraden, wie beim störungsfreien Übergang zu erwarten. An dieser Eichkurve kann man für jede Coniineinwaage ablesen, wann die Base in der gewählten Versuchsanordnung vollkommen in die Säure übergegangen ist.

Betrachtet man nach diesen Ergebnissen Kurve 1 in Abb. 3, so erkennt man ein erstes Plateau nach 5 Stunden, das bis etwa 7 Stunden erhalten bleibt. Ein Vergleich des Verbrauchs an Säure für die erste Stufe in Kurve 1 mit der Eichkurve des reinen Coniins (Abb. 4) ergibt eine Zeit von etwa 5 Stunden für das vollständige Übertreten der 0,32 ml n/50 HCl äquivalenten Base, was mit dem experimentellen Ergebnis übereinstimmt.

Zur Überprüfung der Mikromethode wurde die gravimetrische Bestimmung des Coniins herangezogen, da sämtliche in der Literatur beschriebenen Methoden die Gesamtalkaloide erfassen.

Mit einer grösseren Menge eines einheitlichen Blattpulvers wurde nach der unter C:1) beschriebenen gravimetrischen Coniinbestimmung in 10,0 und 20,0 g der Gehalt an Coniinhydrochlorid festgestellt (Versuch Nr. 14). Mit dem gleichen Pulver wurde nach der zu prüfenden Mikromethode die Flüchtigkeitskurve aufgestellt (Abb. 5).

Das erste Plateau - nach etwa 5 Stunden erreicht - ergibt umgerechnet einen Gehalt von 2,0 mg Coniinhydrochlorid in 1,0 g Trockensubstanz, die Mikromethode 1,9 und 1,8 mg Coniinhydrochlorid (95proz. Ausbeute eingerechnet). Das zweite Plateau ist als ein Mass für den Gesamtalkaloidgehalt anzusprechen, für dessen Bestimmung die Versuchsdauer entsprechend verlängert werden muss.

Die Mikrobestimmung des Coniins in Pflanzenmaterial wird bei einer Versuchsdauer von 6,5 Stunden mit 0,1-0,5 g Trockensubstanz ausgeführt (siehe Versuch Nr. 11). Der Gehalt an Coniin im eingewogenen Pflanzenpulver darf 1,7 mg Coniinhydrochlorid nicht überschreiten. Liegt der Wert über 1,7 mg, so muss die Einwaage verringert werden, da sonst das Plateau zwischen 5 und 7 Stunden, das durch den Flüchtigkeitsunterschied zwischen Coniin und den nachfolgenden Aminen hervorgerufen wird, verschwindet, und es zu einem einheitlichen

Anstieg kommt, bis alle Amine übergegangen sind (siehe Kurve 2 in Abb. 3). Die eingewogene Probe soll nicht mehr Ammonsalz, als 20.0 mg Ammonchlorid entsprechen, aufweisen. Der Fehler der Einzelmessung beträgt $\pm 5\%$.

3. Gehaltsbestimmungen an Schierling

Die in älteren Arbeiten ermittelten Werte für den Gesamtalkaloidgehalt von Schierling differieren stark. Auch wurden die Pflanzen zur Bestimmung nur in wenige Teile (wie z. B. Blatt, Stengel und Wurzel) getrennt.

Für den Gesamtalkaloidgehalt zweijähriger Schierlinge werden von E. H. FARR und R. WRIGHT die in Tabelle 1 angegebenen Werte ermittelt ¹⁷.

Stengel	0.01% - 0.06%
Blätter	0.03% - 0.18%
Blüte	0.09% - 0.24%
Unreife Früchte	0.73% - 0.98%

Tabelle 1

Gesamtalkaloidgehalt im Trockenpulver von
Conium maculatum in Gew.-% nach E. H. FARR u. R. WRIGHT

G. MADAUS und H. SCHINDLER ²³ studierten den Wechsel des Gesamtalkaloidgehalts während der Wachstumsperiode der Pflanzen und konnten einen Anstieg des Gehaltes in den Blättern von 0.096% bis 1.49% vor der Blüte und eine Abnahme bis 0.35% während der Blüte feststellen. Unreife Früchte enthalten 1.62% und reife 1.0% Alkaloid. Dieser Abfall des Alkaloidgehaltes nach der Blüte ist häufig auch an anderen alkaloidhaltigen Pflanzen zu beobachten.

Da zur Auswahl eines möglichst günstigen Zeitpunkts und Ortes für die Applikation von Vorstufen die genaue Kenntnis des Alkaloidspiegels erforderlich ist, wurde der Coniingehalt einzelner Pflanzenteile während der Wachstumsperiode des Schierlings mit der Mikromethode ermittelt.

Die unten beschriebenen Gehaltsbestimmungen wurden an einer einheitlichen Pflanzengruppe ausgeführt, die im Gewächshaus aufgezogen worden war und dort überwintert hatte. Die Pflanzen bestanden im Durchschnitt aus 7 Blättern.

Ende April verharren die 11-12 Monate alten Schierlinge noch in der durch den Winter bedingten Ruheperiode. In zwei Pflanzenreihen verschiedener Größe war der Gehalt an Coniin von Blattspalten wechselnden Alters einer Pflanze gleich (bezogen auf 1.0 g Trockengewicht). Dagegen ist in den jüngsten Blattstielen mehr Coniin enthalten als in den älteren. Es zeigt sich hier eine beginnende Differenzierung (Versuch Nr. 15, Abb. 6).

23) G. MADAUS u. H. SCHINDLER, Arch. Pharmaz. 276, 280 (1938)

Einen Monat später, zu Beginn der Austreibperiode im Frühjahr, wurden die Pflanzen ins Freie gesetzt. In den jüngsten Blattspreiten und -stielen war darauf der Gehalt bis auf das Doppelte der älteren Blätter gestiegen (Abb. 7, Versuch Nr. 16).

Zur Blütezeit im Juli war in der nun 14-15 Monate alten Pflanzengruppe der Coniingehalt in Stengel (2‰ der Trockensubstanz) und Wurzel (1‰ d. T.) gering. Die Alkaloidmenge ist in den jüngsten Blattspreiten gegenüber den älteren Blättern um das 1.5fache erhöht. In der Blüte wird am meisten Alkaloid gefunden (ca. 1% d. T.), jedoch geht der Gehalt in allen Teilen der blühenden Pflanze gleichmäßig zurück, ausgenommen Blüte und Knospe, was bei Pflanzen, die nur Knospen tragen, nicht zu beobachten ist. Die unreifen Früchte enthalten 1,2% Coniinhydrochlorid (Abb. 8, Versuch Nr. 17).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ein rascher Anstieg des Alkaloidgehaltes während keiner Periode festzustellen ist. Dagegen ist der Gehalt in den jüngsten, am stärksten wachsenden Geweben am höchsten; wahrscheinlich befindet sich dort der Ort der Synthese.

Für die Injektion von Vorstufen sollten sich daher die jungen, rasch wachsenden Pflanzenteile eignen.

D. Nachweis freier Aminosäuren in *Conium maculatum* L.

Um Hinweise auf Vorstufen der Coniimbiosynthese zu bekommen, wurde der Gehalt des Schierlings an freien Aminosäuren qualitativ ermittelt (Versuch Nr. 18). Besonders wurde auf das Auftreten cyclischer Iminosäuren geachtet, da schon R. I. MORRISON²⁴ in Schierlingspflanzen Pipecolinsäure (Piperidin-2-carbonsäure) gefunden hatte.

Sechs Pflanzen (6 Monate alt) werden zerkleinert und getrocknet, das Pulver am Soxhlet während 6 Stunden mit Petroläther ausgezogen, um das Chlorophyll zu entfernen, und danach mit 70proz. Äthanol extrahiert. Im Vakuum wird die klare Lösung eingedampft und getrocknet. Der in Wasser gelöste Extrakt lässt im eindimensionalen Papierchromatogramm (Pyridin, n-Butanol, Wasser) keine Pipecolinsäure erkennen. Das zweidimensionale Chromatogramm (1. System: Pyridin, n-Butanol, Wasser; 2. System: sec. Butanol, Ameisensäure, Wasser) zeigt geringe Mengen dieser Aminosäure, neben Alanin, Serin, Glycin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Valin, Leucin, Phenylalanin und Lysin.

24) R. I. MORRISON, Biochem. J. 53, 474 (1953)

Nach R. ROBINSONs Hypothese der Alkaloidbiogenese ist das Auftreten von Lysin in Schierling zu erwarten. Von besonderem Interesse ist der Gehalt der Pflanzen an Pipecolinsäure, die als Abbauprodukt des Lysins ebenfalls Coniinvorstufe sein kann.

E. Synthese der Pipecolinsäure ²⁵

Die gebräuchliche Darstellungsmethode ^{26,27} - Reduktion der Pyridin-2-carbonsäure - bietet keine Möglichkeit zur Herstellung ringmarkierter Pipecolinsäure. Die Markierung des Carboxyl-C Atoms ist nach Versuchen von R. F. DAWSON ⁷ nicht günstig, da diese Gruppe in der Pflanze leicht abgespalten wird,

Andererseits war bekannt, dass α -Chlor- δ -aminovaleriansäure zu Prolin den Ring schliesst ²⁸. Geht man vom höheren Homologen Lysin aus und ersetzt die ω -Aminogruppe durch Halogen, so ist die Bildung von Pipecolinsäure zu erwarten. Lysin wiederum lässt sich leicht in 1-, 2- oder 6-Stellung markieren. ^{29,30,31}

Der Austausch der Aminogruppe gegen das Halogen ist beim Alanin von E. FISCHER und O. WARBURG mit Nitrosylbromid in guten Ausbeuten erzielt worden ³². G. ZEMPLÉN und Z. CSÜRÖS ³³ berichten, dass beim Einwirken von Nitrosylbromid auf γ - ϵ -Aminosäuren keine Bromierung erfolgt.

Nach diesen Versuchen war zu erwarten, dass aus Lysin (XVI), durch Umsetzung mit Nitrosylbromid, die α -Brom- ϵ -aminocaprönsäure (XVII) entsteht, die im alkalischen Milieu spontan den Ring zur Pipecolinsäure (XVIII) schliesst.

25) U. SCHIEDT u. H. G. HÖSS, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 308, 179 (1957)

26) A. LADENBURG, Ber. dtsh. chem. Ges. 24, 640 (1891)

27) F. MENDE, Ber. dtsh. chem. Ges. 29, 2887 (1896)

28) P. B. HAMILTON, J. biol. Chemistry 198, 587 (1952)

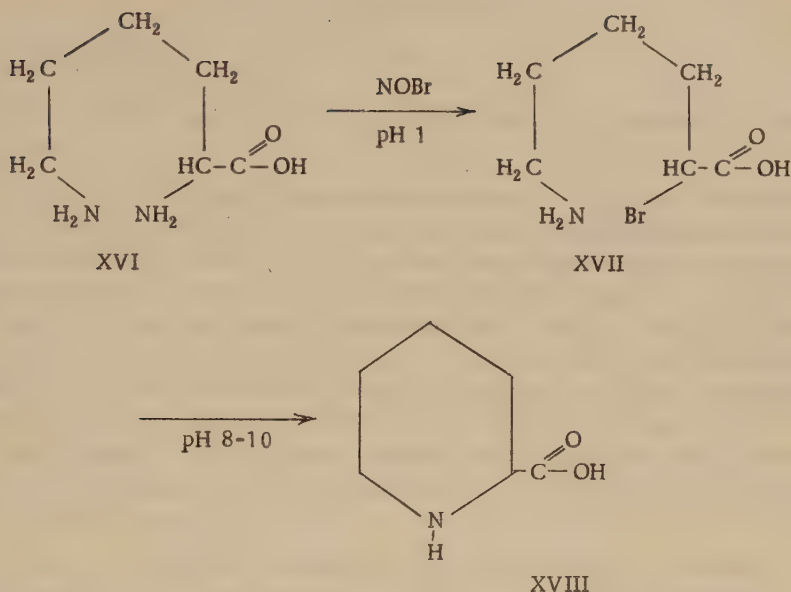
29) S. LINDSTEADT, Acta chem. scand. 7, 340 (1953)

30) D. T. WARNER u. O. A. MOE, J. Amer. chem. Soc. 70, 3918 (1948)

31) M. ROTHSTEIN, J. Amer. chem. Soc. 79, 2009 (1957)

32) E. FISCHER u. O. WARBURG, Liebigs Ann. Chem. 340, 171 (1905)

33) G. ZEMPLÉN u. Z. CSÜRÖS, Ber. ges. Gynäkol. Geburtshilfe 62, 2118 (1929)



L-(+)-Lysin wird in der Kälte mit Nitrosylbromid behandelt. Das Reaktionsprodukt ergibt nach Zusatz von Alkali zwei ninhydrinpositive Substanzen, von denen die eine papierchromatographisch mit Pipecolinsäure identisch ist. Die Pipecolinsäure wird aus dem Reaktionsansatz durch Chromatographie an Dowex 2 abgetrennt, aus Methanol/Aceton umgefällt und zuletzt aus Wasser umkristallisiert. Man erhält Pipecolinsäurehydrochlorid in einer Ausbeute von 34% d. Th. (Versuch Nr. 19).

Die Substanz zeigt eine spezifische Drehung:

$$[\alpha]_D^{25^\circ} : +10,8^\circ \pm 1^\circ (1-2\text{proz. in Wasser})$$

Durch Vergleich mit den in der Literatur angegebenen Werten folgt ^{34,35,36}, dass bei dem Ringschluss D-(+)-Pipecolinsäure entstanden ist.

Beim Übergang von einer Aminosäure in die entsprechende α -Halogensäure mit Hilfe von Nitrosylhalogeniden findet, entgegen der Meinung von E. FISCHER ³², keine Waldensche Umkehr statt. Die Konfigurationsänderung bei der obigen Synthese tritt erst beim Ringschluss auf ³⁷.

34) R. M. ZACHARIUS, J. F. THOMPSON u. F. C. STEWARD, J. Amer. chem. Soc.

74, 2949 (1952)

35) Autoren s. o. J. Amer. chem. Soc. 76, 2909 (1954)

36) R. S. SCHWEET, J. T. HOLDEN u. P. H. LOWY, J. biol. Chemistry 211, 517 (1954)

37) A. NEUBERGER, Advanc. Prot. Chem., Acad. Press N. Y. Band IV, S. 327 ff (1948)

F. Fütterungsversuche

1. Applikationstechnik.

Es gibt mehrere Wege, einer Pflanze eine organische Verbindung von aussen zuzuführen.

Häufig wird die Substanz im Nährmedium gelöst von der Wurzel aufgenommen; dabei werden die physiologischen Bedingungen in der Pflanze nicht verändert. Es zeigt sich jedoch, dass besonders Aminosäuren durch Bodenbakterien leicht angegriffen und abgebaut werden. Selbst in künstlichen Nährkulturen ist es schwierig, über Wochen hinweg die Lösung vollkommen steril zu halten. Auch weiss man von vielen organischen Verbindungen nicht, ob sie durch die Wurzel aufgenommen werden, und in wie weit es bei der Resorption zu einer chemischen Veränderung der Substanz kommt. Ähnliche Vorbehalte muss man beim Auftragen der zuzuführenden Substanz auf die Epidermis machen. Diese besteht aus einer dichten Zellschicht mit einer Kutikula, die häufig von einer Wachsschicht überzogen ist und daher schlecht resorbiert.

Man kann die organische Verbindung auch durch Infusion oder Injektion in Hohlräume der Pflanze einschleusen. Die Zellen, welche die Hohlräume auskleiden, sind oft dünnwandig und nehmen wässrige Lösungen in kurzer Zeit auf. Sie sind zu keiner aktiven Auslese wie die Wurzelhärchen befähigt und resorbieren die applizierten Substanzen ohne Verluste. Bei der Injektion muss darauf geachtet werden, dass die Epidermis möglichst wenig verletzt wird und dass die benützten Hohlräume mit lebenden, aufnahmefähigen Zellen ausgekleidet sind.

Beim Schierling eignen sich die hohlen Blattstiele der einjährigen Pflanze für diese Applikationstechnik. Sie wachsen noch und sind innen nicht verholzt. In den viel grösseren hohlen Stengel der zweijährigen Pflanze ist jedoch eine Injektion nicht ratsam, da er zur Festigung der zwei bis drei Meter hohen Pflanze teilweise verholzt ist. Auch würde hier die radioaktive Verbindung auf alle Organe der Pflanze verteilt werden und eine zu grosse Verdünnung erfahren.

2. Fütterungsversuche mit L-Lysin-dihydrochlorid.

Die Fütterungsversuche mit Lysin wurden an einer einheitlichen Pflanzengruppe ausgeführt, die im Gewächshaus aufgewachsen war und daher keinen Stengel ausgebildet hatte.

Zehn 12 Monate alte Pflanzen mit je 7 Blättern wurden im Frühjahr ins Freie gesetzt. Kurz vor dem Austreiben eines Stengels wurde bei allen zehn Pflanzen der Gehalt eines jungen (max. 8 Tage alt) und eines alten (mind. 9 Tage alt) Blattes bestimmt. Das Ergebnis dieser Bestimmung wird als Nullpunkt für den

Coniingehalt junger und alter Blätter der Pflanzen herangezogen. Es dient ausserdem zur Einteilung der zehn Pflanzen in Gruppen zu je zwei, die einen ähnlichen Coniingehalt aufweisen (Versuch Nr. 20, Tabelle 18/19). Eine Pflanze jeder Gruppe dient als Kontrolle für die natürliche Zunahme des Coniins während der Versuchsdauer; die andere Pflanze ist das eigentliche Versuchsobjekt. In alle Blattstiele einer Versuchspflanze werden insgesamt 0.20 ml einer 4.5proz. L-Lysin-dihydrochlorid-Lösung injiziert.

Die Aufarbeitung von je einer unbehandelten und behandelten Pflanze erfolgt 1, 2, 3, 5 und 7 Tage nach der Injektion, wobei der Gehalt junger und alter Blätter jeweils getrennt bestimmt wird (Abb. 10).

Während in den alten Blättern kein signifikanter Anstieg zu beobachten ist, steigt der Coniingehalt in jungen Blättern bis zum 5. Tag auf das 1.7fache der Kontrollen an und fällt danach rasch ab.

Diese Ergebnisse machen Lysin als Vorstufe bei der Coniinbiogenese wahrscheinlich. Es ist jedoch denkbar, dass der Stoffwechsel durch die Aminosäure stimuliert wird, und dadurch der Anstieg des Coniingehaltes zu erklären ist. Um dies auszuschliessen, wurden Versuche mit Lysin- ^{14}C unternommen.

3. Fütterungsversuche mit L-Lysin- $^{14}\text{C} \cdot 2\text{HCl}$ (uniform markiert)

1. Injektionsversuch mit uniform markiertem L-Lysin- ^{14}C (Versuch Nr. 22) ³⁸

Sieben Pflanzen (12-13 Monate alt, kurz vor Bildung eines Stengels; siehe Versuch Nr. 20) wurden ins Freie gesetzt. Nach drei Wochen wurde in alle Blattstiele (pro Pflanze ca. 7) insgesamt 2.2 mg uniform markiertes L-Lysin- $^{14}\text{C} \cdot 2\text{HCl}$ mit einer Gesamtaktivität von $9.8 \cdot 10^6$ Imp/min und einer spezifischen Aktivität von $9.8 \cdot 10^8$ (Imp/min)/mMol injiziert. Nach drei Tagen wurden die ganzen Pflanzen (ohne Wurzel) getrocknet und auf Coniin aufgearbeitet (siehe Versuch Nr. 2). 118 mg racemisches Coniinhydrochlorid mit einer Gesamtaktivität von $3.1 \cdot 10^3$ Imp/min und einer spezifischen Aktivität von $4.3 \cdot 10^3$ (Imp/min)/mMol wurden isoliert (= 0.032% der eingesetzten Gesamtaktivität, 1 mg Coniin $\cdot \text{HCl}$ = 26 Imp/min). Schmelzpunkt und spezifische Aktivität blieben auch nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Aceton konstant. Die Reinheit des isolierten radioaktiven Coniinhydrochlorids wurde zusätzlich mittels einer CRAIG-Verteilung ³⁹ untersucht (Versuch Nr. 23).

38) U. SCHIEDT u. H. G. HÖSS, Z. Naturforsch., **13b**, 691 (1958)

39) E. HECKER, Verteilungsverfahren im Laboratorium, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstrasse 1955

Für die Verteilung von Coniinhydrochlorid erwies sich das System sec. Butanol/Wasser am besten geeignet. Man kann so auf pufferhaltige Systeme, die im allgemeinen für Alkaloide benützt werden, verzichten. Dadurch wird die Bestimmung des Coniins in den einzelnen Fraktionen erleichtert.

Die experimentell gewonnene Verteilungskurve ergab Übereinstimmung mit der für die Verteilungszahl $G = 0.76$ berechneten (Abb. 11).

Die spezifischen Aktivitäten der Coniinhydrochlorid-Fractionen links und rechts vom Maximum der Verteilungskurve sind innerhalb der Fehlergrenze gleich (Versuch Nr. 23).

Das isolierte radioaktive Coniin ist somit als rein anzusprechen.

2. Injektionsversuch mit uniform markiertem Lysin- ^{14}C (Versuch Nr. 24).

Die geringe Aktivität des isolierten Coniinhydrochlorids kann einerseits bedingt sein durch die kurze Versuchsdauer und andererseits durch die starke Verdünnung in den blattreichen Pflanzen, die als Ganzes aufgearbeitet wurden. Um eine höhere spezifische Aktivität und gleichzeitig Hinweise auf die Verteilung des aktiven Coniins in der Pflanze und damit auf den Ort der Synthese zu bekommen, wurden bei 20 Gewächshauspflanzen (14 Monate alt) die alten Blätter entfernt, sodass jede Pflanze aus je einem jungen, mittleren und älteren Blatt bestand (Abb. 9). Kurz vor der Injektion wurden die Pflanzen in grössere Töpfe umgetopft. In den Stiel des mittleren Blattes jeder Pflanze wurden 0.025 ml injiziert. Die insgesamt applizierten 0.5 ml enthielten 2.2 mg L-Lysin-dihydrochlorid uniform markiert mit einer Gesamtaktivität von $10.2 \cdot 10^6$ Imp/min oder einer spezifischen Aktivität von $10.2 \cdot 10^8$ (Imp/min)/mMol.

Die Pflanzen blieben während des Versuchs im Gewächshaus, um zu reproduzierbaren Ergebnissen zu kommen. Nach fünf Tagen wurde, wie bei Versuch Nr. 2 beschrieben, aufgearbeitet und zwar getrennt in Wurzeln, Stiele alter Blätter, Stiele mittlerer Blätter, Spreiten alter Blätter, Spreiten mittlerer Blätter und junge Blätter (Spreite und Stiel).

Messergebnisse siehe Tabelle 2 (2. Inj. -Vers.)

Das am höchsten markierte Coniin erhält man am Injektionsort (Stiel des mittleren Blattes; 124 (Imp/min)/mg). In den Spreiten der jüngsten Blätter sowie in der Blattspreite des injizierten Stieles finden sich noch etwa 25 (Imp/min)/mg, während in den Wurzeln und alten Blättern die Aktivität gering ist (6-10 (Imp/min)/mg). Diese Versuchsergebnisse weisen auf einen raschen Einbau des Lysins in das Coniin am Injektionsort hin. Auch bestätigt sich die bei den Gehaltsbestimmungen aufgestellte Vermutung, dass in den jungen, wachsenden Geweben des Alkaloid synthetisiert wird und nicht in der Wurzel oder in alten Blättern.

3. Injektionsversuch mit uniform markiertem Lysin- ^{14}C (Versuch Nr. 25).

Um eine noch höhere Aktivität des Coniins zu erzielen, die einen chemischen Abbau der radioaktiven Substanz ermöglicht, wurden aus einer einheitlichen Versuchsgruppe 20 Pflanzen ausgewählt (14 Monate alt), deren jüngste Blätter eine Stiellänge von ca. 8 cm besaßen. Alle anderen Blätter wurden nach dem Umtopfen entfernt. In die Stiele der Blätter wurden insgesamt 0.5 ml einer Lösung injiziert, die 2.2 mg uniform markiertes L-Lysin-dihydrochlorid enthielt und eine Gesamtaktivität von $10.2 \cdot 10^6$ Imp/min oder eine spezifische Aktivität von $10.2 \cdot 10^8$ (Imp/min)/mMol aufwies.

Nach fünftägiger Versuchsdauer im Gewächshaus wurden die Pflanzen aufgearbeitet, getrennt in Wurzel, Stiel und Blattspreite.

Messergebnisse siehe Tabelle 2 (3. Inj. -Vers.)

Durch die Injektion des aktiven Lysins in die noch jüngeren Gewebe, sowie durch die Entfernung der älteren Pflanzenteile, konnte die spezifische Aktivität des Coniins weiter erhöht werden. Es zeigt sich deutlich - neben der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse - , dass in den jüngsten Pflanzenteilen der Syntheseort liegt. Der rasche Einbau an der Applikationsstelle tritt noch klarer hervor (Blattstiele = 274 (Imp/min)/mg).

Tabelle 2: Messergebnisse der Injektionsversuche mit Lysin-¹⁴C

2. Injektionsversuch

Gesamtaktivität $10.2 \cdot 10^6$ Imp/min

Injiziert:

Spez. Aktivität $10.2 \cdot 10^8 \frac{\text{Imp/min}}{\text{mMol}}$

	isoliertes Coniin·HCl in mg	$\frac{\text{Imp/min}}{\text{mg}}$	tot. Akt. Imp/min	% d. eingesetzt. tot. Akt.	spez. Akt. $\frac{\text{Imp/min}}{\text{mMol}}$
junges Blatt Stiel + Spreite	33.0	23	760	0.0075	$3.8 \cdot 10^3$
Stiel des mittl. Blattes	6.7	124	831	0.0082	$2.0 \cdot 10^4$
Spreite des mittl. Blattes	22.6	25	567	0.0056	$4.1 \cdot 10^3$
Stiel des alten Blattes	9.5	6	57	0.0006	$3.7 \cdot 10^2$
Spreite des alten Blattes	18.4	6	111	0.001	$3.7 \cdot 10^2$
Wurzel	18.9	10	189	0.0018	$1.6 \cdot 10^3$

Isoliert $2515 \frac{\text{Imp/min}}{109 \text{ mg}} = 23 \frac{\text{Imp/min}}{\text{mg}} = 0.026\%$ der eingesetzten totalen Aktivität

3. Injektionsversuch

Gesamtaktivität $10.2 \cdot 10^6$ Imp/min

Injiziert:

Spez. Aktivität $10.2 \cdot 10^8 \frac{\text{Imp/min}}{\text{mMol}}$

	isoliertes Coniin·HCl in mg	$\frac{\text{Imp/min}}{\text{mg}}$	tot. Akt. Imp/min	% d. eingesetzt. tot. Akt.	spez. Akt. $\frac{\text{Imp/min}}{\text{mMol}}$
Wurzel	20.7	6	124	0.0012	$3.7 \cdot 10^2$
Stiel	2.0	274	548	0.0054	$4.5 \cdot 10^4$
Blattspreite	26.8	80	2140	0.020	$1.3 \cdot 10^4$

Isoliert $2810 \frac{\text{Imp/min}}{50 \text{ mg}} = 56 \frac{\text{Imp/min}}{\text{mg}} = 0.028\%$ der eingesetzten totalen Aktivität

Coniin·HCl von Stiel u. Spreite = $2688 \frac{\text{Imp/min}}{28.8 \text{ mg}} = 93 \frac{\text{Imp/min}}{\text{mg}}$

G. Zum Mechanismus der Biosynthese des Coniins

Die in den vorstehenden Abschnitten erhaltenen Befunde, dass man nach Injektion von radioaktiv markiertem Lysin in wachsende Gewebe von Schierlingspflanzen radioaktives Coniin isolieren kann, stützen die Hypothese von R. ROBINSON, der für die Bildung des Piperidinrings des Coniins Lysin als Vorstufe annimmt.

Da uniform markiertes Lysin verwendet wurde, besteht prinzipiell die Möglichkeit, dass die Aminosäure zuerst zu radioaktiven kleineren Bruchstücken katabolisiert wird, die dann teilweise in das Coniin eingebaut werden. Die Aktivitäten des isolierten Coniins machen diese Möglichkeit jedoch unwahrscheinlich.

Damit erhebt sich die Frage nach den Zwischenstufen, über die Coniin aus Lysin entsteht.

Vom Stoffwechsel des Lysins (XIX) ist bekannt, dass es bei höheren Pflanzen und Tieren wahrscheinlich durch eine L-Aminosäureoxydase in α -Stellung oxydativ desaminiert wird. Dabei entsteht die α -Keto- ε -aminocaprönsäure (XXI)⁴⁰. Es wird angenommen, dass die ε -Aminogruppe des Lysins hierbei - etwa durch Acetylierung - geschützt wird (XX)⁴¹.

Bei In-Vitro-Versuchen konnte A. MEISTER nachweisen, dass die α -Keto- ε -aminocaprönsäure (XXI) in reversibler Reaktion die entsprechende cyclische Schiffsche Base, die Δ^1 -Piperidein-2-carbonsäure (XXII) bildet⁴⁰. Sowohl Homogenate von Organen der Ratte wie auch Pflanzenextrakte (Bohne, Erbse) enthalten ein Enzym, das die Δ^1 -Piperidein-2-carbonsäure in einer DPNH bzw. TPNH abhängigen Reaktion zur L-Pipecolinsäure (XXIII) hydriert^{42,43}. Bei Ratten, Neurospora und höheren Pflanzen ist der Übergang von Lysin-¹⁴C in Pipecolinsäure nachgewiesen^{44,45,46}. Wie gezeigt wurde, kommt Pipecolinsäure auch im Schierling vor.

40) A. MEISTER, J. biol. Chemistry 206, 577 (1954)

41) E. WORK, Amino Acid Metabolism, McElroy u. Glass, Baltimor 1955, S. 462

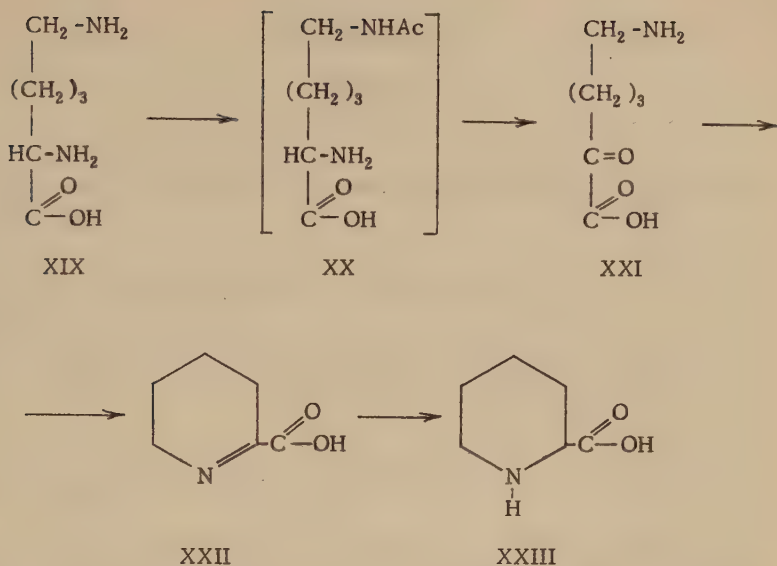
42) A. MEISTER u. S. D. BUCKLEY, Biochim. biophysica Acta Amsterdam 23,
202 (1957)

43) A. MEISTER, A. N. RADHAKRISHNAN u. S. D. BUCKLEY, J. biol. Chemistry
229, 789 (1957)

44) N. GOBBELAAR u. F. C. STEWARD, J. Amer. chem. Soc. 75, 4341 (1953)

45) M. ROTHSTEIN u. L. L. MILLER, J. biol. Chemistry 211, 851 (1954)

46) R. S. SCHWEET, J. T. HOLDEN u. P. H. LOWY, J. biol. Chemistry 211, 517
(1954)



In einer vor kurzem erschienenen Arbeit nimmt E. LEETE statt der Desaminierung des Lysins zu α -Keto- ϵ -aminocapronsäure (XXI) eine Decarboxylierung zu Cadaverin (1,5-Diaminopentan) an, das als Zwischenstufe bei der Piperidinbiogenese diskutiert wird. ⁴⁷

Weitere Einblicke in die Biogenese des Coniins können durch Applikation von radioaktiver Pipecolinsäure erhalten werden, deren Synthese ausgearbeitet wurde. Die Frage nach der Herkunft der n-Propylseitenkette des Coniins bleibt offen.

47) E. LEETE, J. Amer. chem. Soc. 80, 4393 (1958)

III. VERSUCHE

Allgemeines

Die Analysen wurden vom
Mikroanalytischen Laboratorium Alfred Bernhardt im Max-Planck-Institut für
Kohlenforschung

und

Mikroanalytischen Laboratorium Dr. A. Schöller Kronach/Ofr.

ausgeführt.

Die Schmelzpunkte sind nicht korrigiert.

Die Schierlingsfrüchte wurden von der Firma H. Bornträger Offstein/Worms
bezogen.

Das uniform markierte Lysin- ^{14}C wurde von The Radiochemical Centre
Amersham geliefert.

Bei den Versuchen mit radioaktiven Substanzen wurden die Impulse in einem
Gasflusszähler der Firma Tracerlab Boston USA (45-50proz. Ausbeute) auf Alu-
miniumschälchen bei einer Spannung von 1.35 KV gemessen.

Lysin wurde in wässriger Lösung mit Spuren von REI auf die Schälchen aufge-
tragen und mit einer IR-Lampe getrocknet. Coniin-HCl wurde in Substanz auf den
Schälchen abgewogen, in 1-2 Tropfen Chloroform gelöst und verteilt und ohne
Erwärmung getrocknet.

Die totalen und spezifischen Aktivitäten wurden nach dem folgenden Beispiel
berechnet:

Coniin-HCl Einwaage [γ]	$\varnothing$ a) [mm]	Einwaage/ πr^2 [γ/cm^2]	Selbst- absorption b)	Imp.	Min.
911	16	455	12.5%	596	5
Imp/min	Imp/min -Leerwert c)	+Selbst- absorption b)	$\frac{\text{Imp/min}}{\text{mg}}$	Ges. Akt. =tot. Akt. Imp/min d)	Spez. Akt. $\frac{\text{Imp/min}}{\text{mMol}}$
119	99	113 Imp/min	124	831	$2.0 \cdot 10^4$

a) Durchmesser der Kreisfläche der auf das Schälchen aufgetragenen Substanz.

b) Ermittelt nach der Selbstabsorptionskurve für Eiweisstoffe.

c) Bei einem Leerwert von 20 Imp/min.

d) Bei 6.7 mg isoliertem Coniin-HCl.

VERSUCHE

Versuch Nr. 1

Isolierung von Coniin aus Pflanzenmaterial

Anwendbar ab 100 g Trockensubstanz

Die grob zerkleinerten und 12 Stunden bei 60° getrockneten Pflanzenteile (100 g Trockenpulver) werden in 300 ml Wasser aufgeschwemmt; danach werden 20 ml n-Oktanol und 20 ml 20proz. Natronlauge zugegeben. Das Gemisch wird einer Wasserdampfdestillation unterworfen, bis in die 10 ml 36proz. Salzsäure enthaltende Vorlage 500 ml Wasser übergegangen sind. Das Destillat wird mit 2 · 60 ml Petroläther ausgeschüttelt (zur Entfernung des Oktanols), die Petrolätherphasen mit 2 · 10 ml Wasser gewaschen und die vereinigten wässrigen Phasen im Vakuum (12 mm Hg) zur Trockene eingedampft. Nach scharfem Trocknen über Phosphorpentoxyd und Kaliumhydroxyd wird die Substanz durch Schütteln mit insgesamt 150 ml absolutem Chloroform in mehreren Anteilen ausgezogen, wobei durch eine Glasfritte abgesaugt wird. Der Chloroformextrakt wird im Vakuum (12 mm Hg) vorsichtig eingedampft, getrocknet und am Rückflusskühler in etwa 300 ml absolutem Aceton gelöst, durch eine Glasfritte filtriert und langsam zur Kristallisation des Coniinhydrochlorids auf 1/5 des ursprünglichen Volumens eingengt. Aus der Mutterlauge kann nochmals durch Eindampfen auf 1/4 eine Coniinfraction gewonnen werden. Schmelzpunkt des reinen razemischen Coniinhydrochlorids $F = 212^{\circ}\text{--}213^{\circ}$.

$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N} \cdot \text{HCl}$ (163,7) Ber. C 58,70 H 11,08 N 8,26
Gef. C 58,73 H 10,96 N 8,56

Versuch Nr. 2

Gravimetrische Bestimmung des Coniins

Anwendbar bei 10-100 g Trockensubstanz

Die Pflanzen werden in dünnen luftigen Lagen während 12 Stunden im Trockenschrank bei 60° getrocknet, danach in der Reibschale grob gepulvert und im Exsikkator über Phosphorpentoxyd getrocknet (24 Stunden). 20,0 g Pflanzenpulver werden in 125 ml Wasser eingetragen. Nach einer Stunde werden 10 ml n-Oktanol und 5 g Kaliumkarbonat zugegeben. Man leitet sofort Wasserdampf durch das Gemisch, bis in die mit 3 ml 36proz. Salzsäure beschickten Vorlage etwa 250-300 ml Wasser übergegangen sind. Aus dem Destillat entfernt man mit 2 · 20 ml Petroläther das n-Oktanol, wäscht den Petroläther mit 2 · 5 ml Wasser und dampft die vereinigten wässrigen Phasen bei Wasserstrahlvakuum zur Trockene ein. Die bei der Destillation im Kolben verspritzte Substanz wird in Äthanol ge-

löst und der Alkohol im Rotationsverdampfer bei 20° abgezogen. Nach scharfem Trocknen über Phosphorpentoxyd und Kaliumhydroxyd wird die Substanz durch kräftiges Schütteln mit absolutem Chloroform (insgesamt 100 ml) extrahiert. Von ungelösten Ammonsalzen wird durch eine Glasfritte abgesaugt. Der im Rotationsverdampfer zur Trockene gebrachte Chloroformextrakt wird aus Aceton umkristallisiert, wobei die Mutterlauge aufgearbeitet wird (siehe Versuch Nr. 1).

Versuch Nr. 3

Wechselnde Mengen homogener Schierlingsblattpulver werden halbiert und dem einen Teil Coniinhydrochlorid zugesetzt. Nach der unter Versuch Nr. 2 beschriebenen Methode wird der Gehalt beider Teile bestimmt.

Tabelle 3

Vers. Nr.	Versuch			Kontrolle			% d. Th.
	Blatt Pulver g	Coniin·HCl Zusatz mg	Coniin·HCl gef. mg	Blatt Pulver g	Coniin·HCl gef. mg	Differenz Versuchs- Kontrolle mg	
I	10.0	13.9	45.3	10.0	31.7	13.6	98
II	20.0	16.3	71.4	20.0	56.3	15.1	93
III	10.0	11.6	46.7	10.0	35.7	11.0	95

Versuch Nr. 4

Sechs Conwayschälchen wurden mit 4-6 mg Coniinhydrochlorid und 0.5 ml 10proz. Natronlauge beschickt, der Rand leicht eingefettet und mit einer Glasplatte verschlossen. Unter verschiedenen Bedingungen hinsichtlich Zeit und Temperatur wurde das übergegangene Coniin in der Vorlage, die 1.0 ml n/10 Salzsäure enthielt, mit n/10 Natronlauge acidimetrisch bestimmt.

Methylrot als Indikator, titriert auf reines Gelb; 0.1 ml n/10 Salzsäure entsprechen 1.637 mg Coniin·HCl oder 1.277 mg Coniinbase.

Tabelle 4

Bedingungen	Eingesetzt Coniin·HCl mg	Gefunden Coniin·HCl mg	% d. Th.
20 Std. 20°	4.7	3.3	70
20 Std. 20°	4.1	2.8	68
30 Std. 20°	5.8	4.3	73
30 Std. 70°	3.8	2.95	77
30 Std. 70°	4.5	3.95	88
30 Std. 70°	4.2	3.4	81

Versuch Nr. 5

In einen 50 ml Schliffkolben (NS 29) wird das abgewogene Coniinhydrochlorid eingeführt. Nach Zusatz von 1 ml 5proz. Natronlauge stellt man sofort einen Weithalsmikroerlenmeyer (5 ml) hinein, der 1.0 ml n/10 bzw. n/50 Salzsäure enthält (je nach Einwaage). Ein gut gefetteter Schliffstopfen verschliesst den Kolben und wird mit zwei starken Federn gesichert. Nach 12-16stündigem Stehen im Trockenschrank bei 60° werden die Kolben geöffnet und die überschüssige Säure im Mikroerlenmeyer mit n/10 bzw. n/50 Natronlauge gegen Methylrot zurücktitriert.

1.0 ml n/10 Salzsäure entsprechen 16.37 mg Coniin-HCl oder 12.72 mg Coniinbase; 1.0 ml n/50 Salzsäure entsprechen 3.274 mg Coniin-HCl oder 2.544 mg Coniinbase.

Tabelle 5

Eingesetzt Coniin-HCl mg	Gefunden Coniin-HCl mg	% d. Th.
3.1	2.95	96
4.2	4.26	101
0.5	0.52	105
0.8	0.83	104
0.9	0.87	97

Versuch Nr. 6

In einen 50 ml Schliffkolben (NS 29) gibt man 5-20 mg Ammonchlorid, 2.8 ml 10proz. Natronlauge und 1.4 ml 40proz. Formaldehydlösung. Nach dem Einbringen eines Mikroerlenmeyers (5 ml) mit 1.0 ml n/10 Salzsäure wird der Kolben gut verschlossen und nach 4-18 Stunden (20° und 60°) die nicht verbrauchte Säure zurücktitriert (siehe Versuch Nr. 5).

Tabelle 6

Bedingungen	Eingesetzt NH ₄ Cl mg	Verbrauch an n/10 HCl ml
4 Std. 20°	5	0.00
18 Std. 20°	10	0.01
4 Std. 60°	5	0.00
18 Std. 60°	20	0.01

Versuch Nr. 7

Wie bei Versuch Nr. 6, nur unter Zusatz von 0.6-1.2 mg Coniinhydrochlorid bei einer Temperatur von 60°.

Tabelle 7

Versuchs- dauer	Eingesetzt Coniin·HCl mg	Eingesetzt NH ₄ Cl mg	Gefunden Coniin·HCl mg	% d. Th.
10 Std.	1.20	5	1.29	107
18 Std.	0.60	10	0.59	98
18 Std.	0.80	10	0.84	105
18 Std.	0.60	20	0.62	104
18 Std.	0.80	20	0.77	96

Es berechnet sich der mittlere Fehler des Mittelwerts von 5 Messungen zu $\pm 2.2\%$ und der mittlere Fehler der Einzelmessung zu $\pm 5\%$.

Versuch Nr. 8

Je 1.0 g Blattpulver wird in einen 50 ml Rundkolben (NS 29) gegeben, 2.5 ml Formaldehydlösung 40proz., 3 ml Wasser und nach fünf Minuten 4.5 ml 10proz. Natronlauge zugesetzt. Danach stellt man einen Mikroerlenmeyer (5 ml) mit 1.0 ml n/50 Salzsäure in den Kolben und verschliesst gut (siehe Versuch Nr. 5). Zwischen 9 und 32 Stunden wird stündlich ein Kolben geöffnet und die verbrauchte Salzsäure im Mikroerlenmeyer mit n/50 Natronlauge bestimmt (Methylrot als Indikator, titriert auf reines Gelb).

Die Versuchsreihe wurde mit drei Trockenpulvern ausgeführt, die von verschiedenen alten Schierlingsblättern stammten.

Siehe Abb. 1

Tabelle 8

Std.	Versuch I n/50 HCl Verbrauch ml	Versuch II n/50 HCl Verbrauch ml	Versuch III n/50 HCl Verbrauch ml
9	0.09	0.18	0.21
10	0.11	0.14	0.22
11	0.12	0.24	0.26
12	0.13	0.28	-

Std.	Versuch I	Versuch II	Versuch III
13	0.13	-	0.38
14	0.14	0.30	0.36
15	0.15	0.31	-
16	0.15	0.31	0.37
17	0.15	0.31	0.37
18	0.18	0.36	0.43
19	0.18	0.35	-
20	0.18	0.34	0.43
21	0.19	0.34	0.46
22	0.20	0.39	0.53
23	0.20	0.39	0.51
24	0.21	0.39	0.52
25	0.22	-	-
26	0.22	-	-
27	0.23	-	-
28	0.23	-	-
30	0.23	-	-
32	0.23	-	-

Versuch Nr. 9

Je 1.0 g getrocknetes Schierlingsblattpulver wurde wie unter Versuch Nr. 8 behandelt. Statt 3 ml Wasser fügte man 1.0 ml 1%o Coniinhydrochloridlösung (= 1.0 mg) und 2 ml Wasser hinzu. In einer weiteren Versuchsreihe wurde ohne Zusatz von Coniinhydrochlorid im gleichen Pulver die Flüchtigkeitskurve bestimmt (1.0 mg Coniin·HCl entsprechen 0.31 ml n/50 Salzsäure).

Siehe Abb. 2: Kurve 1 und 2

Tabelle 9

Std.	Versuch I ohne Zusatz ml n/50 HCl	Versuch II mit 1.0 mg Coniin·HCl ml n/50 HCl	Differenz II-I ml n/50 HCl
10	-	0.34	-
11	0.17	0.40	0.23
12	0.25	-	-
13	-	0.42	-
14	-	0.51	-
15	0.36	0.48	0.12
16	0.38	0.51	0.13

Std.	Versuch I	Versuch II	Differenz
17	0.38	0.49	0.11
18	0.41	0.50	0.09
19	0.40	0.55	0.15
20	0.41	0.56	0.15
21	0.41	0.55	0.14
22	0.40	0.56	0.16
23	0.46	0.59	0.13
24	0.47	-	-
25	0.49	0.60	0.11
26	0.49	0.62	0.13
27	0.51	-	-
30	0.54	0.63	0.09

Versuch Nr. 10

Je 1.0 g getrocknetes Graspulver wird, wie in Versuch Nr. 8 beschrieben, behandelt. Statt 3 ml Wasser setzt man 1.0 ml 1proz. Ammonchloridlösung (= 10 mg), 1.0 ml 1%ige Coniinhydrochloridlösung (= 1 mg) und 1.0 ml Wasser hinzu. Zwischen 11 und 30 Stunden wird stündlich die nicht verbrauchte n/50 Salzsäure titriert (1.0 mg Coniin-HCl entsprechen 0.31 ml n/50 HCl).

Siehe Abb. 2: Kurve 3

Tabelle 10

Std.	11	13	14	16	17	18	19	21	22	23	24	25	30
Verbrauch n/50 HCl ml	0.14	0.16	0.15	0.17	0.20	0.20	0.19	0.20	0.23	0.24	0.24	0.22	0.23

Versuch Nr. 11

Je 0.50 g Schierlingsblattpulver (24 Stunden über P_2O_5 getrocknet) werden in die Mikrokjeldahlapparatur nach R. MARKHAM ⁴⁸ zusammen mit 4 ml Wasser und 2 ml n-Oktanöl gebracht. Bei stark schäumenden Pflanzenpulvern ist die Anwendung von 1-2 Tropfen Silikonöl nicht zu umgehen. Nach dem Zusatz von 2 ml 20proz. Natronlauge wird Wasserdampf durchgeleitet bis 15-25 ml Destillat in die mit 1.0 ml 36proz. Salzsäure beschickten Vorlage übergegangen sind. In einem 50 ml Rundkolben (NS 29) wird das Destillat bei 12 mm Hg zur Trockene eingengt, die Substanz in Äthanol gesammelt und der Alkohol im Rotationsver-

48) R. MARKHAM, Biochem. J. 36, 790 (1942)

dampfer bei 20° und 12 mm Hg oder über Nacht im Eindampftopf nach E. HECKER und P. KARLSON ⁴⁹ bei 40°-50° abgezogen.

Nun gibt man in den Kolben 1.4 ml 40proz. Formaldehydlösung und 2 ml Wasser, schwenkt gut um, damit sich die Substanzen lösen können, stellt einen Glasfuss in jeden Kolben und verschliesst leicht mit einem eingefetteten Schliffstopfen. Nach 3-5 Minuten wird 2.8 ml 10proz. Natronlauge zugefügt und ein Weithalsmikroerlenmeyer (5 ml), der mit 1.0 ml n/50 Salzsäure beschickt ist, auf den Glasfuss gestellt. Nach einem kurzen Umschwenken kann fest verschlossen werden.

Die Kolben werden in einen 60° warmen Trockenschrank gestellt, um nach 3-30 Stunden je einen Versuch zu unterbrechen und die verbrauchte Säure mit n/50 Natronlauge zu bestimmen (Methylrot als Indikator, titriert auf reines Gelb; 1.0 ml n/50 HCl entsprechen 3.274 mg Coniin·HCl oder 2.544 mg Coniinbase).

Der Versuch wurde mit einem homogenen Blattpulver in zwei Reihen ausgeführt, wobei einer Reihe je 1.0 mg Coniin·HCl zu 0.50 g Blattpulver gemischt worden war (1.0 mg Coniin·HCl entsprechen 0.31 ml n/50 HCl).

Siehe Abb. 3

Tabelle 11

Std.	Versuch I	Versuch II	Differenz
	ohne Zusatz ml n/50 HCl	mit 1.0 mg Coniin·HCl ml n/50 HCl	II-I ml n/50 HCl
3	0.25	0.51	0.26
4	0.30	0.55	0.25
4.5	0.33	-	-
5	0.37	-	-
7	0.38	0.64	0.26
9	0.44	0.72	0.28
12	0.44	0.75	0.31
16	0.45	0.76	0.31
24	0.46	0.77	0.31
30	0.44	0.74	0.30

49) E. HECKER u. P. KARLSON, Chemie-Ing. -Techn. 25, 397 (1953)

Versuch Nr. 12

In zwei Versuchsreihen werden 0.33 bzw. 2.0 mg Coniinhydrochlorid in 50 ml Rundkolben gegeben und wie bei Versuch Nr. 11, Abschnitt 2, verfahren. Zwischen 0.5 und 6 Stunden wird je ein Kolben geöffnet und die übergegangene Menge Base bestimmt.

0.33 mg Coniin·HCl entsprechen 0.10 ml n/50 HCl

2.0 mg Coniin·HCl entsprechen 0.61 ml n/50 HCl

Siehe Abb. 12

Tabelle 12

0.33 mg Coniin·HCl		2.0 mg Coniin·HCl	
Std.	Verbrauch ml n/50 HCl	Std.	Verbrauch ml n/50 HCl
3	0.07	0.5	0.02
3.5	0.08	1	0.22
4	0.10	1.5	0.24
4.5	0.09	2	0.35
5	0.11	2.5	0.40
		3	0.49
		4	0.55
		4.5	0.53
		5	0.57
		5.5	0.54
		6	0.54
		7	0.57
		8	0.60

Versuch Nr. 13

In drei Versuchsreihen werden je 2 mg, 1 mg und 0.33 mg Coniinhydrochlorid und 10 mg Ammonchlorid in 50 ml Rundkolben gegeben und wie bei Versuch Nr. 11, Abschnitt 2 verfahren. Zwischen 2 und 7 Stunden wird je ein Kolben geöffnet und die Menge der übergegangenen Base bestimmt.

Siehe Abb. 4

0.33 mg Coniin·HCl entsprechen 0.10 ml n/50 HCl

1.0 mg Coniin·HCl entsprechen 0.31 ml n/50 HCl

2.0 mg Coniin·HCl entsprechen 0.61 ml n/50 HCl

Tabelle 13

0,33 mg Coniin·HCl		1,0 mg Coniin·HCl		2,0 mg Coniin·HCl	
Std.	Verbrauch ml n/50 HCl	Std.	Verbrauch ml n/50 HCl	Std.	Verbrauch ml n/50 HCl
2,5	0,05	3,5	0,19	4	0,45
2,75	0,07	3,75	0,22	5	0,51
3	0,09	4	0,25	5,5	0,54
3,25	0,10	4,25	0,29	5,75	0,57
3,5	0,10	4,5	0,30	6	0,59
4	0,11	5	0,29	6,25	0,59
4,5	0,11	6	0,30	6,5	0,61
				7	0,61

Versuch Nr. 14

Mit 60 g eines einheitlichen Blattpulvers wird der Gehalt an Coniinhydrochlorid in 10,0 und 20,0 g nach der gravimetrischen Bestimmung ermittelt (siehe Versuch Nr. 2). Zur Überprüfung der Mikromethode wird die Flüchtigkeitskurve dieses Pulvers bestimmt (siehe Versuch Nr. 11).

Siehe Abb. 5

I. Gravimetrische Coniinbestimmung:

10,0 g Trockensubstanz = 18,3 mg Coniin·HCl (95proz. Ausbeute einberechnet)

In 1,0 g 1,8 mg Coniin·HCl

20,0 g Trockensubstanz = 38,4 mg Coniin·HCl (95proz. Ausbeute einberechnet)

In 1,0 g 1,9 mg Coniin·HCl

II. Coniinmikrobestimmung

Tabelle 14

Std.	1	2	3	4	5	5,25	5,5	6
Verbrauch ml n/50 HCl	0,01	0,15	0,18	0,24	0,31	0,32	0,32	0,32
Std.	6,75	7	7,25	7,5	8	9	10	
Verbrauch ml n/50 HCl	0,32	0,32	0,36	0,37	0,36	0,37	0,36	

Das Plateau der Flüchtigkeitskurve von 0,50 g Trockenpulver liegt zwischen 5 und 7 Stunden bei einem Verbrauch von 0,32 ml n/50 HCl, was einem Gehalt von 1,0 mg Coniin·HCl entspricht.

1,0 g Schierlingsblattpulver enthält damit nach der Mikromethode 2,0 mg Coniin·HCl.

Versuch Nr. 15

Von zwei Reihen verschieden grosser Pflanzen (je 4-5, 11-12 Monate alt) werden jeweils die gleichaltrigen Blätter gesammelt. Dies ergibt je vier Gruppen von Blättern verschiedener Altersstufen, die getrocknet und danach in Blattstiel und Spreite getrennt werden. Auch die Wurzeln der grossen und kleineren Pflanzen werden vereinigt und getrocknet. In 0.50 g Trockenpulver von Stielen, Spreiten und Wurzeln wird der Coniingehalt mit der Mikromethode bestimmt (siehe Versuch Nr. 11).

Siehe Abb. 6

Tabelle 15
Gehalt in mg-% Coniin·HCl

	1. =jüngst. Blatt		2. Blatt		3. Blatt		4. Blatt		Wurzel
	Spreite	Stiel	Spreite	Stiel	Spreite	Stiel	Spreite	Stiel	
gross. Pfl.	4.1	3.7	4.0	3.3	4.0	2.6	3.9	2.2	1.3
klein. Pfl.	2.5	-	2.6	3.0	2.6	2.8	2.5	2.0	0.8

Versuch Nr. 16

Von den unter Versuch Nr. 15 beschriebenen Pflanzengruppen werden willkürlich sechs Schierlinge (12-13 Monate alt) ausgewählt und ins Freie gepflanzt. Nach drei Wochen werden die gleichaltrigen Blätter und die Wurzeln gesammelt und jeweils getrennt getrocknet. Danach wird wie bei Versuch Nr. 15 in Blattstielen, Spreiten und Wurzeln aufgeteilt und in jeweils 0.50 g Trockenpulver der Coniingehalt mit der Mikromethode bestimmt (siehe Versuch Nr. 11).

Siehe Abb. 7

Tabelle 16
Gehalt in mg-% Coniin·HCl

1. =jüngst. Blatt		2. Blatt		3. Blatt		4. Blatt		Wurzel
Spreite	Stiel	Spreite	Stiel	Spreite	Stiel	Spreite	Stiel	
5.1	4.7	4.4	3.6	3.5	2.6	3.1	1.8	1.0

Versuch Nr. 17

Von zwei ausgewachsenen im Freien stehenden Pflanzengruppen (je 4, 14-15 Monate alt) tragen die einen nur Knospen, während die anderen Knospen und Blüten nebeneinander aufweisen. Es werden eine Anzahl gleichaltriger und sich entsprechender Pflanzenteile in beiden Gruppen gesammelt und getrennt getrocknet. In 0,10-0,50 g Trockenpulver wird der Coniingehalt nach der Mikromethode ermittelt (siehe Versuch Nr. 11).

Siehe Abb. 8

Tabelle 17

Pflanz. - teil	Einwaage		ml n/50 HCl Verbrauch		Gehalt mg-% o. ‰ Coniin·HCl	
	blüh.	knosp.	blüh.	knosp.	blüh.	knosp.
Frucht unreif	0,10	-	0,37	-	12,1	-
Blüte	0,10	-	0,32	-	10,5	-
Knospe	0,15	0,15	0,27	0,27	5,9	5,9
Junge Blätter	0,15	0,15	0,24	0,29	5,2	6,3
dto. Stiele	0,20	0,25	0,18	0,34	3,0	4,4
Mittlere Blätter	0,20	0,20	0,25	0,31	4,1	5,1
dto. Stiele	0,20	0,20	0,20	0,25	3,3	4,1
Alte Blätter	0,20	0,20	0,26	0,30	4,2	4,9
dto. Stiele	0,25	0,20	0,20	0,21	2,6	3,4
Stengel oben	0,30	0,25	0,14	0,15	1,5	2,0
Stengel Mitte	0,25	0,25	0,09	0,12	1,2	1,6
Stengel unten	0,25	0,25	0,12	0,15	1,6	2,0
Wurzel	0,40	0,40	0,09	0,12	0,7	1,0

Versuch Nr. 18

Aminosäuren in Conium maculatum L.

Sechs Gewächshauspflanzen (6 Monate alt) werden zusammen mit ihren Wurzeln zerkleinert und im Trockenschrank in dünnen Lagen bei 60° getrocknet (20.6 g). Dieses Pulver wird am Soxhlet 6 Stunden mit 250 ml abs. Petroläther ausgezogen. Danach wird das Pflanzenpulver mit 200 ml 70proz. Äthanol auf dem Wasserbad extrahiert (4 Stunden), abfiltriert und nochmals mit 100 ml Äthanol mazeriert. Die vereinigten filtrierten Äthanolösungen werden i. V. (12 mm Hg) eingedampft. Die Substanz wird in 100 ml Wasser gelöst und dreimal zur Entfernung des restlichen Chlorophylls mit 20 ml Äther ausgeschüttelt. Von der wässrigen Lösung wird 0.01-0.04 ml auf Papier (Schleicher u. Schüll Nr. 2043b) aufgetragen und im System Pyridin/n-Butanol/Wasser 1:1:1 (10 Stunden Laufzeit) aufsteigend chromatographiert. Das zweidimensionale Papierchromatogramm (1. System: Pyridin/n-Butanol/Wasser 1:1:1, 10 Stunden Laufzeit; 2. System: Sec. Butanol/Ameisensäure 88proz./Wasser 7.5:1.5:1, 12 Stunden Laufzeit) wird mit 0.05proz. Ninhydrinlösung (wässriges n-Butanol) besprüht und 10 Minuten bei 80-100° entwickelt.

Versuch Nr. 19

Synthese der D-(+)-Pipicolinsäure

1.5 g L-(+)-Lysin-dihydrochlorid und 0.3 g Kaliumbromid werden in 5 ml Wasser gelöst. Nach Zugabe von 1.5 g Brom wird unter Kühlung mit Eiswasser während 5 Stunden ein starker Strom von Stickoxyd in das Gemisch eingeleitet (hergestellt nach J. Thiele ⁵⁰). 2-3 Stunden nach Beginn des Einleitens werden weitere 0.5 g Brom zugesetzt. Nach Beendigung der Reaktion wird Stickstoff durchgeleitet, bis das überschüssige Brom vertrieben ist und die farblose Lösung mit 2n Natronlauge auf pH 8-10 gebracht.

Papierchromatographisch lassen sich in der Lösung nach Besprühen mit Ninhydrin zwei Substanzen vom R_f 0.45 und 0.33, jedoch kein Lysin mehr nachweisen (Pyridin/n-Butanol/Wasser = 1:1:1, Whatman Nr. 4, aufsteigend). Authentische Pipicolinsäure zeigt R_f 0.45.

Das Reaktionsgemisch wird auf eine Säule von Dowex 2-8 gebracht (OH-Form, 200-400 mesh, Höhe 25-30 cm, Durchmesser 2.0 cm). Man wäscht mit 100 ml ausgekochtem Wasser und eluiert mit 0.3 n Salzsäure. Das Eluat (etwa 300 ml) wird i. V. zur Trockene gebracht; der Rückstand stellt nach Papierchromatogramm und IR-Spektrum einheitliches D-Pipicolinsäurehydrochlorid dar.

50) J. THIELE, Liebigs Ann. Chem. 253, 246 (1889)

Zur Analyse wird zweimal aus Aceton/Methanol umgefällt und dann aus Wasser umkristallisiert. Man erhält 370 mg (34% d. Th.) D-(+)-Pipicolinsäurehydrochlorid vom Zers. Punkt 256°-257° in dünnen länglichen Plättchen, $[\alpha]_D^{25} : +10.8^\circ \pm 1^\circ$ (1-2proz. wässriger Lösung).

$C_6H_{11}O_2 \cdot HCl$ (165.6) Ber. C 43.51 H 7.31 N 8.46 Cl 21.41
Gef. C 43.56 H 7.37 N 8.17 Cl 21.34

Versuch Nr. 20

Zehn Pflanzen (12 Monate alt) mit je 7 Blättern waren im Frühjahr ins Freie gesetzt worden. Zu Beginn des Austreibens eines Stengels wurde der Gehalt junger (max. 8 Tage alt) und alter (mind. 9 Tage alt) Blätter nach der Mikromethode (siehe Versuch Nr. 11) bestimmt. Diese Ergebnisse werden als Nullpunkt des Coniingehalts junger und alter Blätter bezeichnet. Die zehn Pflanzen werden in Gruppen zu je zweien eingeteilt, die einen ähnlichen Coniingehalt aufweisen.

Als erster Tag eines Blattes gilt definitionsgemäss der Tag, an dem aus der Scheide eines alten Stiels das junge Blatt vollständig heraustritt. Es wird mit einem farbigen Faden markiert.

Eine Pflanze jeder Gruppe dient als Kontrolle für die Zunahme des Coniins während der Versuchsdauer; die andere ist das Versuchsobjekt. In sämtliche Stiele der Versuchspflanze wird insgesamt 0.20 ml einer Lösung injiziert, die in 1.0 ml 45 mg L-Lysin-dihydrochlorid und 34.5 mg Natriumbikarbonat enthält.

Injiziert wird mit einer Vollglasspritze 1 ml (Praec.-Tub.-Glasspritze), eingeteilt in 1/100 ml und V_2 A-Kanülen 10-15 cm lang, 0.6 mm Durchmesser, von der Basis der Blattspreite zur Stielbasis.

Nach der Injektion wachsen die Pflanzen im Freien bei einer Tagestemperatur von 20°-27°; nachts tritt eine Abkühlung auf 6°-10° ein.

Die jungen Blätter (max. 8 Tage alt) und alten Blätter (mind. 9 Tage alt) je einer unbehandelten und behandelten Pflanze werden nach 1, 2, 3, 5 und 7 Tagen geerntet und getrennt getrocknet. In 0.25 g Trockenpulver wird der Coniingehalt alter und junger Blätter nach der Mikromethode bestimmt (siehe Versuch Nr. 11).

Siehe Abb. 10

Tabelle 18

Coniingehalt alter Blätter nach Injektion von Lysin nach 1-7 Tagen. Die un-
behandelten Kontrollpflanzen sind durch den Zusatz K (Spalte 1) gekennzeichnet.

Pflanz. Nr.	mg-% Coniin·HCl vor Versuchs- beginn	ml injiz. Lösung	Versuchs- dauer	mg-% Coniin·HCl nach dem Versuch	proz. Zunahme von Coniin·HCl a)
1	4.6	0.20	24 Std.	4.3	-3
1K	4.8	-	24 Std.	4.7	-
2	3.8	0.20	2 Tage	4.9	+7
2K	3.6	-	2 Tage	4.4	-
3	2.7	0.20	3 Tage	3.5	+6
3K	3.0	-	3 Tage	3.6	-
4	3.3	0.20	5 Tage	3.6	-5
4K	3.3	-	5 Tage	3.8	-
5	5.1	0.20	7 Tage	5.9	-8
5K	3.1	-	7 Tage	3.9	-

a) abzüglich des Coniingehaltes der unbehandelten Kontroll-Pflanzen.

Tabelle 19

Junge Blätter vergl. Tabelle 18

Pflanz. Nr.	mg-% Coniin·HCl vor Versuchs- beginn	ml injiz. Lösung	Versuchs- dauer	mg-% Coniin·HCl nach dem Versuch	proz. Zunahme von Coniin·HCl a)
1	6.3	0.20	24 Std.	6.2	-6
1K	6.7	-	24 Std.	7.0	-
2	8.6	0.20	2 Tage	10.6	+22
2K	8.1	-	2 Tage	8.3	-
3	6.2	0.20	3 Tage	9.3	+53
3K	6.7	-	3 Tage	6.6	-
4	6.9	0.20	5 Tage	12.0	+72
4K	6.8	-	5 Tage	7.0	-
5	11.4	0.20	7 Tage	14.2	+20
5K	7.2	-	7 Tage	7.5	-

a) abzüglich des Coniingehaltes der unbehandelten Kontroll-Pflanzen.

Versuch Nr. 21

0,2 μ radioaktives L-Lysin- ^{14}C -2HCl (uniform markiert, 815 Imp/min Gesamtaktivität) wird mit L-Lysin $\cdot$ 2HCl als Testsubstanz im System Pyridin, n-Butanol, Wasser 1:1:1 papierchromatographiert (Schleicher u. Schüll Nr. 2043 b, aufsteigend). Nach 8 Stunden wird die Seite, auf der die Testsubstanz läuft, mit Ninhydrin entwickelt. Der R_f -Wert beträgt 0,20. Die andere Seite wird entlang der gesamten Laufstrecke des aktiven Lysins in 2 cm breite und 1 cm lange Stückchen zerschnitten, die auf Aluminiumschälchen gemessen werden. Die einzelnen Papierstückchen haben folgende Gesamtaktivität:

Tabelle 20

Papier Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Gesamtaktivit. Imp/min	2	-2	3	5	35	92	12	4	0	-3	-1	-1	0	3	3	2	2	1
Papier Nr.	19	20	21	22	23	24	25											
Gesamtaktivit. Imp/min	3	3	1	-6	2	0	-1											

Für das Aktivitätsmaximum bei Nr. 6 ergibt sich der R_f -Wert zu 0,19. Danach ist das für die folgenden Versuche zu verwendende radioaktiv markierte Lysin als einheitlich anzusprechen.

Für die Injektionsversuche mit Lysin- ^{14}C wurden Pflanzen einer einheitlichen Gruppe benützt, die im Gewächshaus überwintert hatten. Injiziert wurde wie bei Versuch Nr. 20 beschrieben.

Versuch Nr. 22

Sieben Pflanzen (12-13 Monate alt) wurden ins Freie gesetzt. Kurz vor Bildung eines Stengels wurde in sämtliche Blattstiele (ca. 7 pro Pflanze) insgesamt 2,2 mg uniform markiertes L-Lysin- ^{14}C $\cdot$ 2HCl mit einer Gesamtaktivität von $9,8 \cdot 10^6$ Imp/min (spez. Akt. = $9,8 \cdot 10^8$ (Imp/min)/mMol) injiziert. Die Pflanzen blieben während der Versuche im Freien. Nach 3 Tagen wurde, wie unter Versuch Nr. 2 beschrieben, aufgearbeitet - nach Entfernung der Wurzeln.

Man gewann 118 mg razemisches Coniinhydrochlorid vom Schmelzpunkt $F = 213,5^\circ$.

Die Gesamtaktivität beträgt $3,1 \cdot 10^3$ Imp/min oder die spez. Akt. $4,3 \cdot 10^3$ (Imp/min)/mMol. Es werden 0.032 % der Gesamtaktivität in das Coniin eingebaut.

Die spez. Aktivität des Coniinhydrochlorids betragen nach dem Umkristallisieren aus Aceton:

1. Umkristallisieren	$4,4 \cdot 10^3$ (Imp/min)/mMol	
2.	$4,1 \cdot 10^3$	"
3.	$4,4 \cdot 10^3$	"

Versuch Nr. 23

Craig-Verteilung des Coniinhydrochlorids

43,4 mg radioaktiv markiertes Coniinhydrochlorid (aus Versuch Nr. 22) mit einer spez. Akt. von $4,3 \cdot 10^3$ (Imp/min)/mMol wird bei $T = 22^\circ$ in der Mikroapparatur nach E. HECKER⁵¹ im System sec. Butanol/Wasser ($V = 2,0$) über $n = 18$ Verteilungsschritte verteilt (Grundprozess).

Siehe Abb. 11

Die spez. Akt. verschiedener Fraktionen betragen:

Frakt. Nr. 4	$= 4,0 \cdot 10^3$ (Imp/min)/mMol
Frakt. Nr. 6	$= 4,5 \cdot 10^3$ (Imp/min)/mMol
Frakt. Nr. 8	$= 4,2 \cdot 10^3$ (Imp/min)/mMol
Frakt. Nr. 9	$= 4,3 \cdot 10^3$ (Imp/min)/mMol
Frakt. Nr. 11	$= 4,5 \cdot 10^3$ (Imp/min)/mMol

Versuch Nr. 24

Zwanzig 14 Monate alte Schierlingspflanzen werden zugeschnitten, sodass sie aus je drei Blättern bestehen (siehe Abb. 9), ein jüngstes mit 2-4 cm Stiellänge, ein mittleres (12-14 cm Stiellänge) und ein älteres (18-20 cm Stiellänge).

Die Pflanzen werden zwei Tage vor Versuchsbeginn in grössere Töpfe umgepft. In die Stiele der mittleren Blätter werden bei zwanzig Pflanzen im Gewächshaus 0,5 ml einer Lösung injiziert, die 2,2 mg Lysin-dihydrochlorid uniform markiert mit einer Gesamtaktivität von $10,2 \cdot 10^6$ Imp/min oder spez. Akt. von $10,2 \cdot 10^8$ (Imp/min)/mMol enthält.

Beim Injizieren wurde die Nadel von der Basis des Stieles zur Blattspreite eingeführt. Während der fünftägigen Versuchsdauer herrschte warmes sommerliches Wetter. Die Temperaturen im gelüfteten und beschatteten Gewächshaus betrugen am Tag 25-35°, in der Nacht 20°.

51) E. HECKER, Chemie-Ing. -Techn. 85, 505 (1953)

Die Aufarbeitung erfolgte nach der Trennung in alte, mittlere, junge Blattspreiten, deren Stiele und die Wurzeln nach der unter Versuch Nr. 2 angegebenen Methode.

Trockengewicht der geernteten Pflanzenteile:

Junges Blatt (Spreite + Stiel)	4.8 g
Spreite d. mittl. Blattes	5.8 g
Spreite d. alten Blattes	5.8 g
Stiel d. mittl. Blattes	3.45 g
Stiel d. alten Blattes	4.05 g
Wurzel	21.8 g

Messergebnisse siehe Tabelle 2 Seite 20

Versuch Nr. 25

Bei zwanzig Pflanzen (14 Monate alt) wurden alle Blätter bis auf das jüngste entfernt (Stiellänge 8 cm). 0.5 ml einer Lösung, die 2.2 mg Lysindihydrochlorid uniform markiert mit einer Gesamtaktivität von $10.2 \cdot 10^6$ Imp/min oder einer spez. Akt. von $10.2 \cdot 10^8$ (Imp/min)/mMol enthielt, wurden in die Stiele injiziert.

Der kleine Durchmesser der jungen Stiele machte eine Injektion von der Basis der Blattspreite zur Stielbasis notwendig.

Der Versuch lief fünf Tage im Gewächshaus bei gleichen Bedingungen wie unter Versuch Nr. 24 angegeben.

Bei der Aufarbeitung wurde in Wurzeln, Stiele und Blätter getrennt.

Trockengewicht der Pflanzenteile:

Wurzel	27.0 g
Blattspreite	4.7 g
Stiele	1.2 g

Messergebnisse siehe Tabelle 2 Seite 20

IV. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird ein neues Verfahren zur präparativen Isolierung von Coniin aus Pflanzenmaterial beschrieben. Die daraus entwickelten quantitativen Bestimmungsmethoden für Coniin erlauben das Alkaloid in 0,1-10 g (Mikromethode) und in 10-100 g Schierlingstrockenpulver (Makromethode) titrimetrisch bzw. gravimetrisch zu ermitteln. Die Methoden beruhen auf der Wasserdampflichkeit des Coniins und auf seinem hohen Dampfdruck.

Mit Hilfe dieser Bestimmungsmethoden wird der Coniingehalt des Schierlings während der gesamten Wachstumsperiode untersucht.

Dabei zeigt sich, dass der Alkaloidgehalt in jungen wachsenden Geweben am grössten ist. Gegen Ende der Wachstumsperiode wird eine Abnahme des Coniin-gehalts in Stengeln und Blättern gefunden, während der Alkaloidgehalt von Blüten und Früchten besonders hoch ist.

Der Gehalt an Aminosäuren in *Conium maculatum* wird qualitativ ermittelt und gezeigt, dass neben Alanin, Serin, Glycin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Valin, Leucin und Phenylalanin Lysin und Pipecolinsäure vorkommen. Diese beiden Aminosäuren werden als mögliche Vorstufen der Coniinbiosynthese angenommen.

Eine Synthese von Pipecolinsäure aus Lysin über α -Brom- ϵ -aminocapronsäure wird beschrieben. Dieser Darstellungsweg eignet sich zur Gewinnung von ringmarkierter Pipecolinsäure.

Durch Injektion von unmarkiertem Lysin in Schierlingsblätter steigt der Alkaloidgehalt auf das 1,7fache der Kontrollen an. Die Applikation von uniform markiertem Lysin in verschieden grosse Pflanzen ergibt radioaktives Coniin. An der Injektionsstelle und den jungen wachsenden Geweben weist das isolierte Coniin die höchste spezifische Aktivität auf. Dies deutet auf einen raschen Einbau des Lysins in Coniin in wachsendem Gewebe hin. Lysin ist eine Vorstufe des Piperidinrings des Coniins.

Flüchtigkeitskurve der Basen von drei Blattpulvern verschieden
alter Schierlinge.

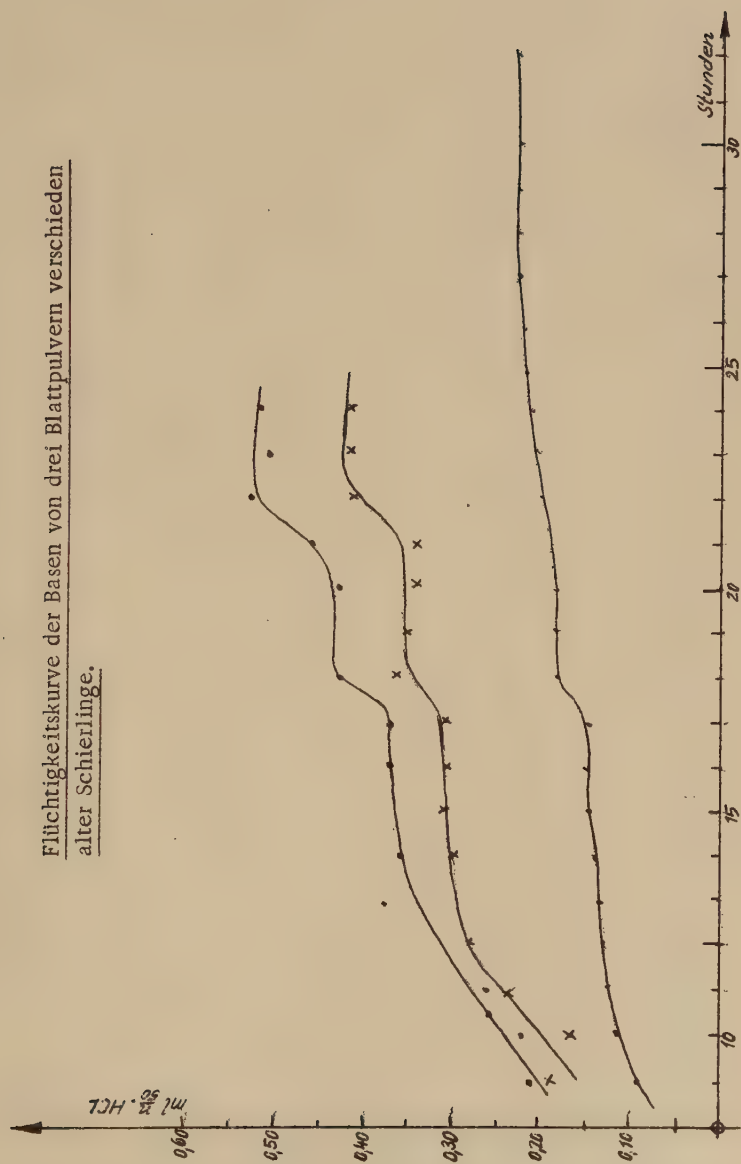


Abb. 1

Flüchtigkeit von Pflanzenbasen, 1,0 mg Coniin · HCl entspricht 0,31 ml n/50 HCl

1 = Schierlingsblattpulver bei Zusatz von 1,0 mg Coniin · HCl

2 = Schierlingsblattpulver ohne Zusatz

3 = Graspulver bei Zusatz von 1,0 mg Coniin · HCl

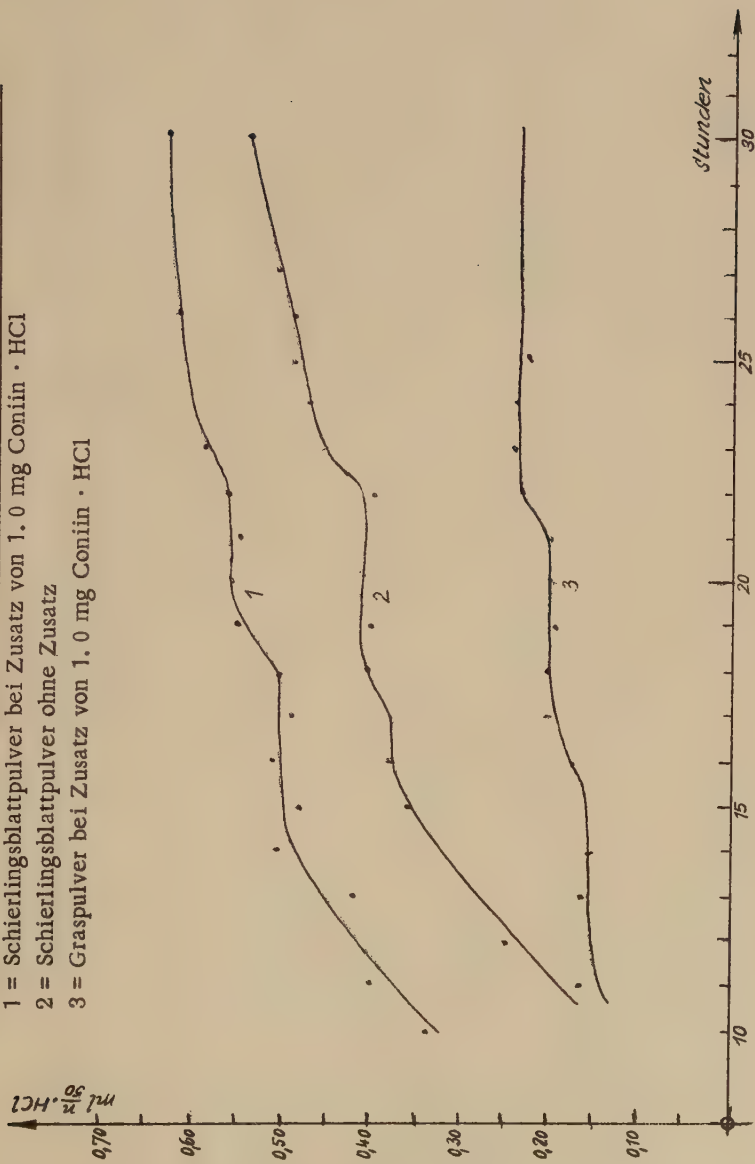


Abb. 2

Flüchtigkeitskurven der Basen von Schierlingsblattpulver, 1.0 mg Coniin · HCl entsprechen 0.31 ml n/50 HCl

2 = Schierlingsblattpulver bei Zusatz von 1.0 mg Coniin · HCl
 1 = Schierlingsblattpulver ohne Zusatz

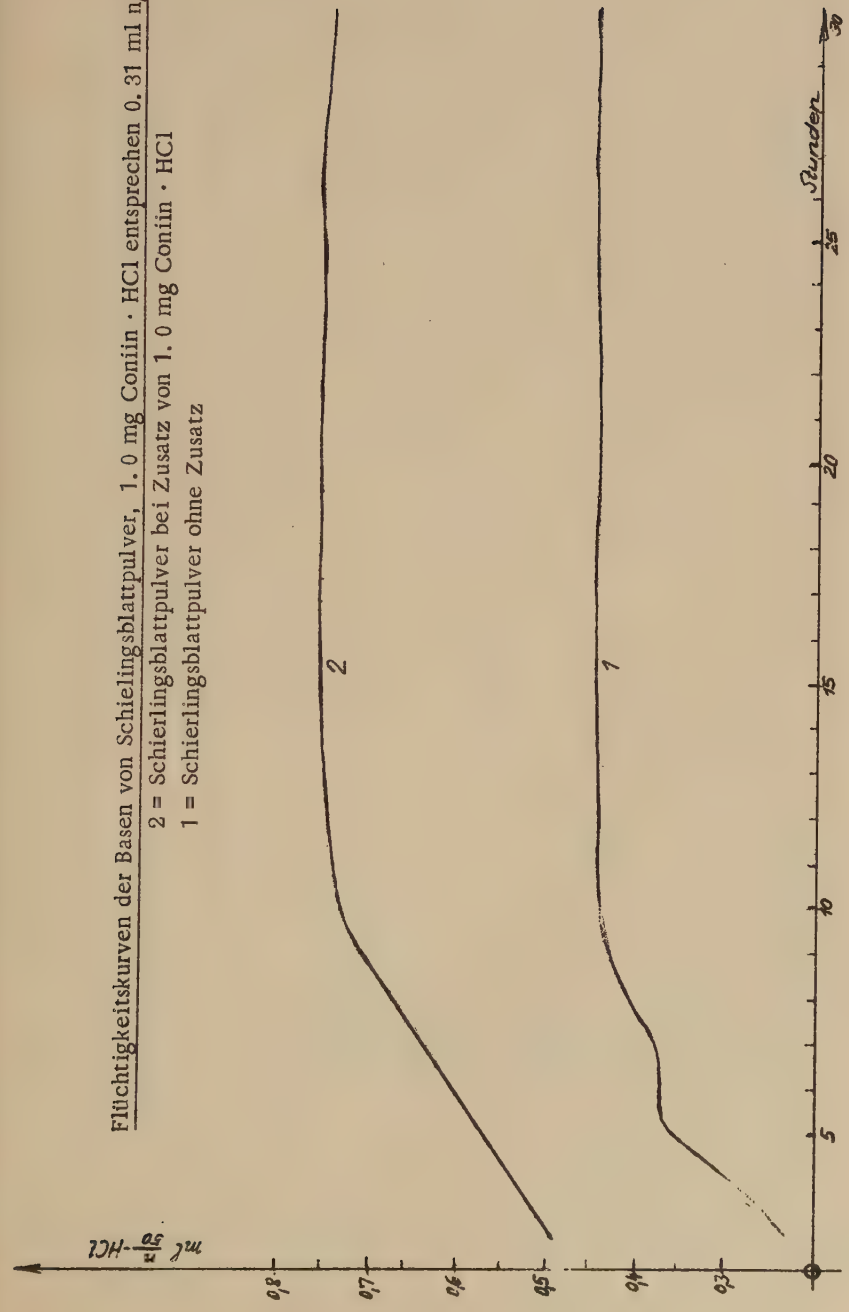


Abb. 3

1 = Flüchtigkeitskurve von 0.33 mg Coniin · HCl bei Zusatz von 10 mg NH_4Cl
 (entspr. Verbr. 0.10 ml n/50 HCl)

2 = Flüchtigkeitskurve von 1.0 mg Coniin · HCl bei Zusatz von 10 mg NH_4Cl
 (entspr. Verbr. 0.31 ml n/50 HCl)

3 = Flüchtigkeitskurve von 2.0 mg Coniin · HCl bei Zusatz von 10 mg NH_4Cl
 (entspr. Verbr. 0.61 ml n/50 HCl)

----- = Eichkurve für vollständigen Übergang des Coniins

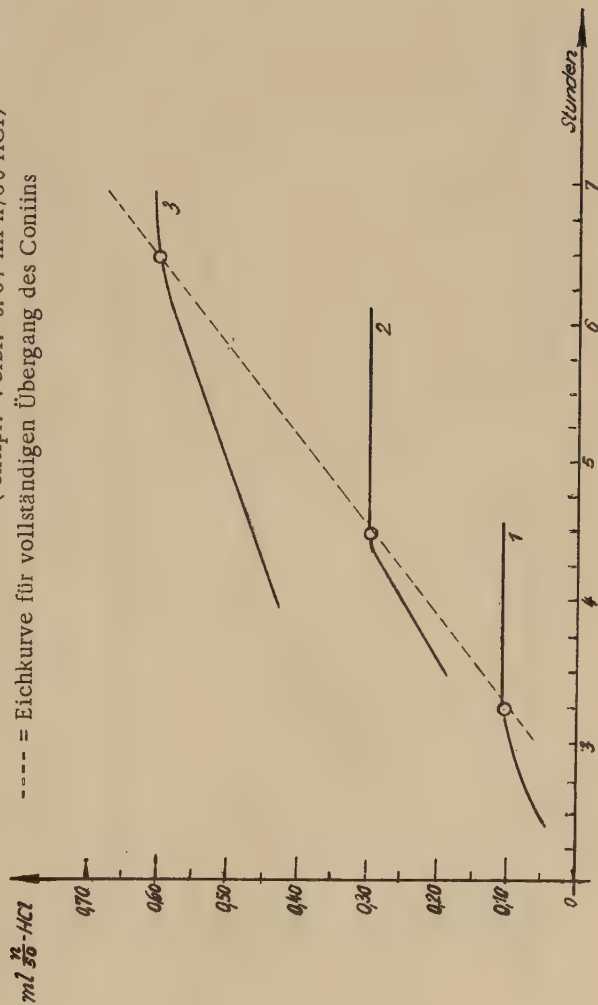


Abb. 4

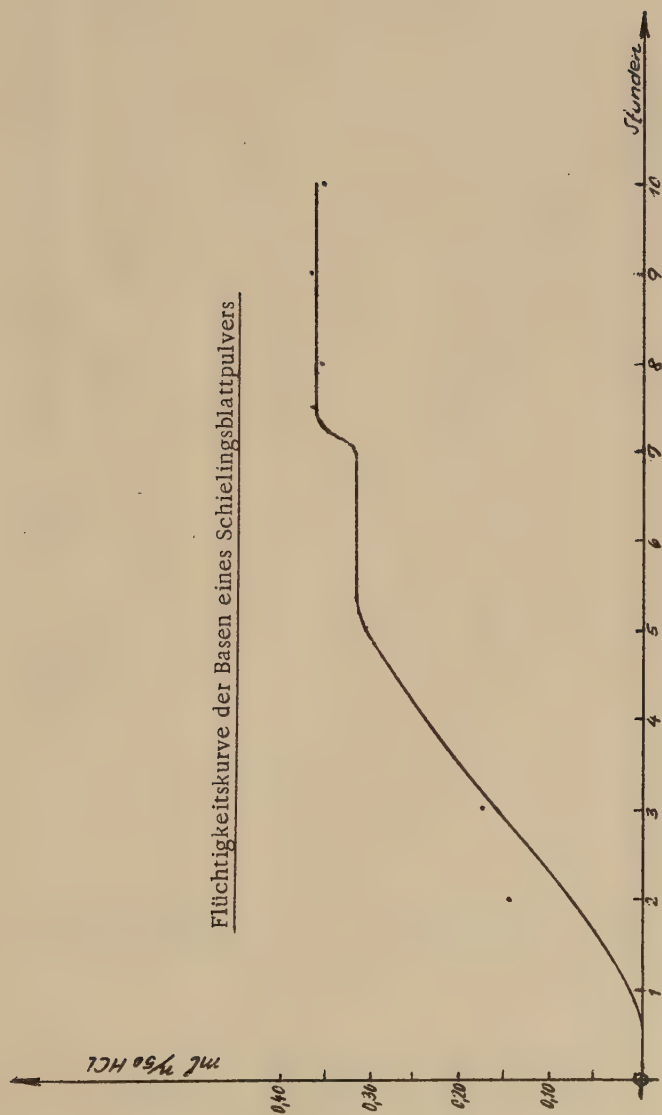


Abb. 5

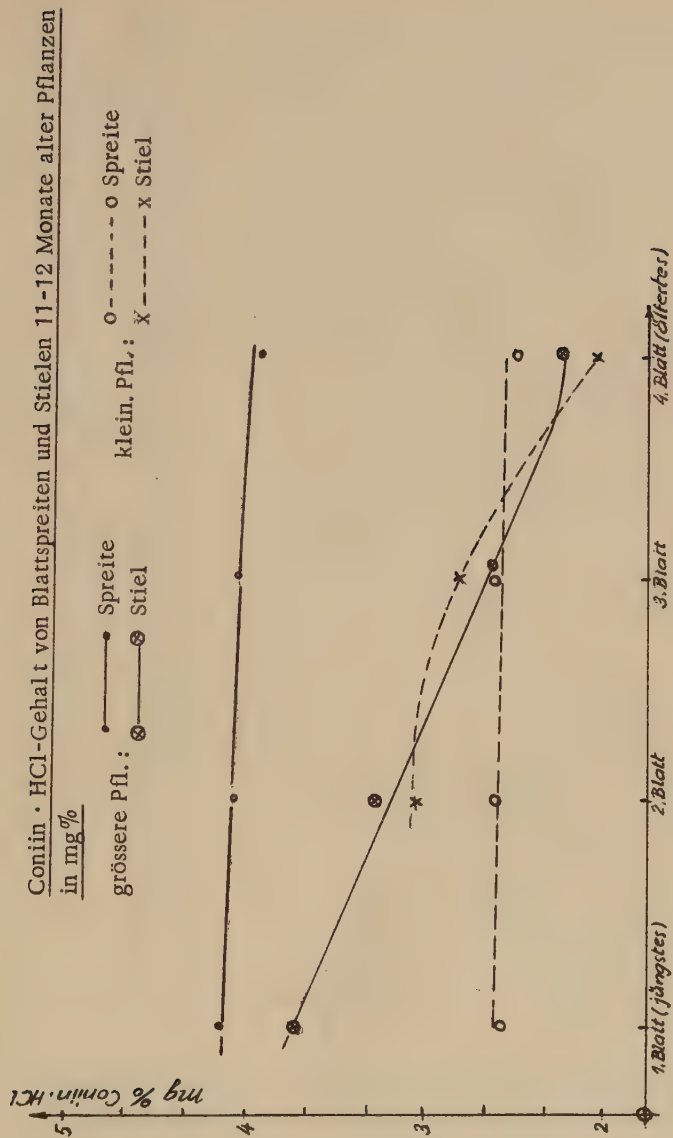


Abb. 6

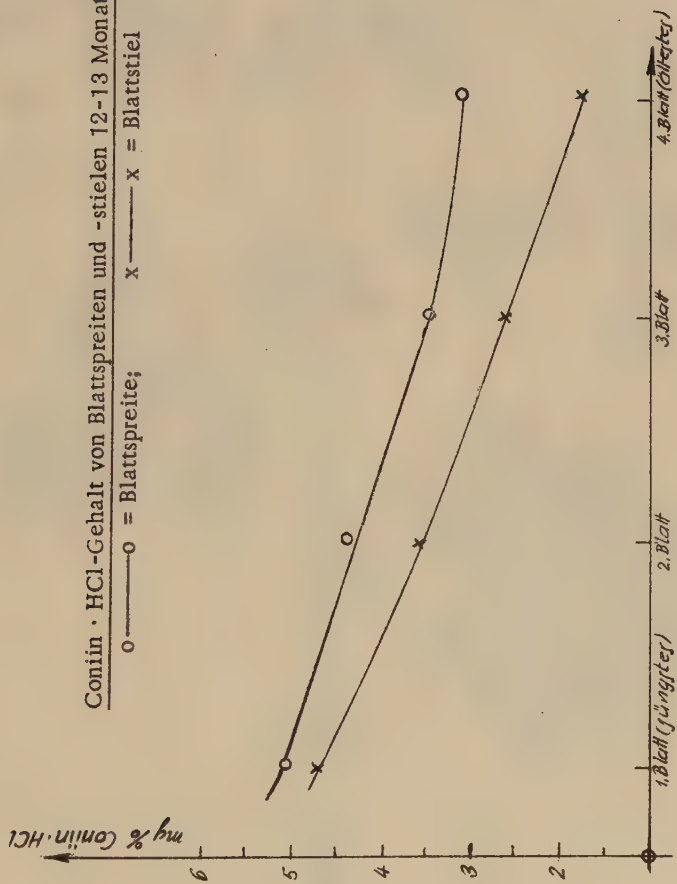


Abb. 7

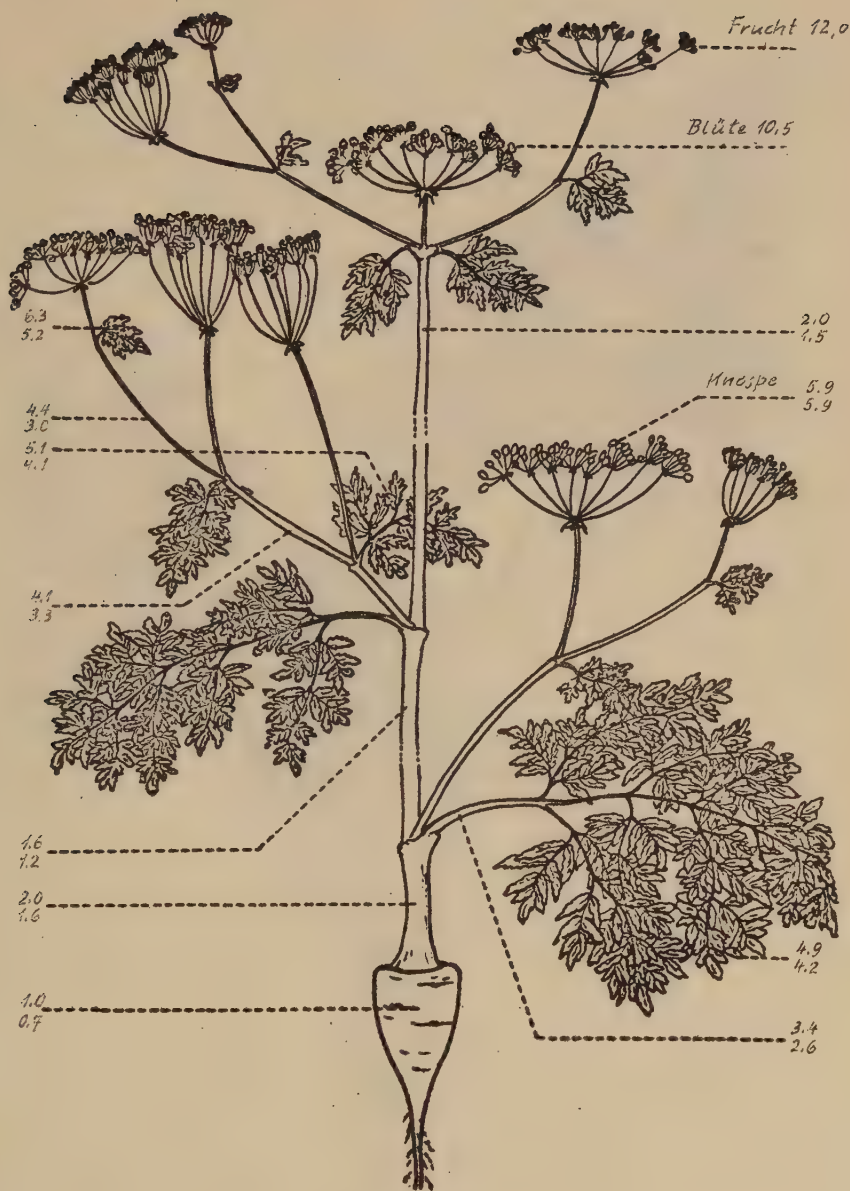


Abb. 8

Gehalt an Coniin · HCl in mg% einer blühenden (untere Zahl) und knospenden (obere Zahl) Schierlingspflanze.



Abb. 9

Typische 12-14 Monate alte Schierlingspflanze (im Gewächshaus gezogen),
die für Vorstufenversuche verwendet wurde.

Kurve 1 = Prozentuale Zunahme des Coningehalts alter Blätter injizierter Pflanzen,
abzüglich der bei unbehandelten Pflanzen beobachteten Coninzunahme.

Kurve 2 = dto. junge Blätter

Näheres im Text

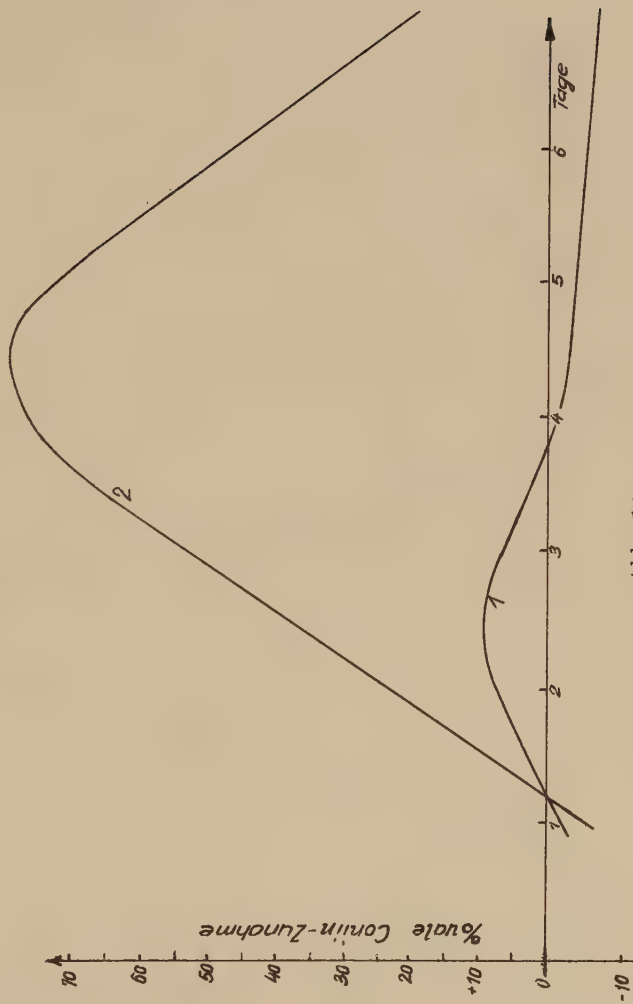


Abb. 10

Grundprozess der Craig-Verteilung, $n = 18$, $V = 2, 0$.

System sec. Butanol/Wasser, $V = 2, 0$.

• — = experimentell gewonnene Kurve

x - - - - x = auf $G = 0, 76$ nach 39) berechnete Kurve

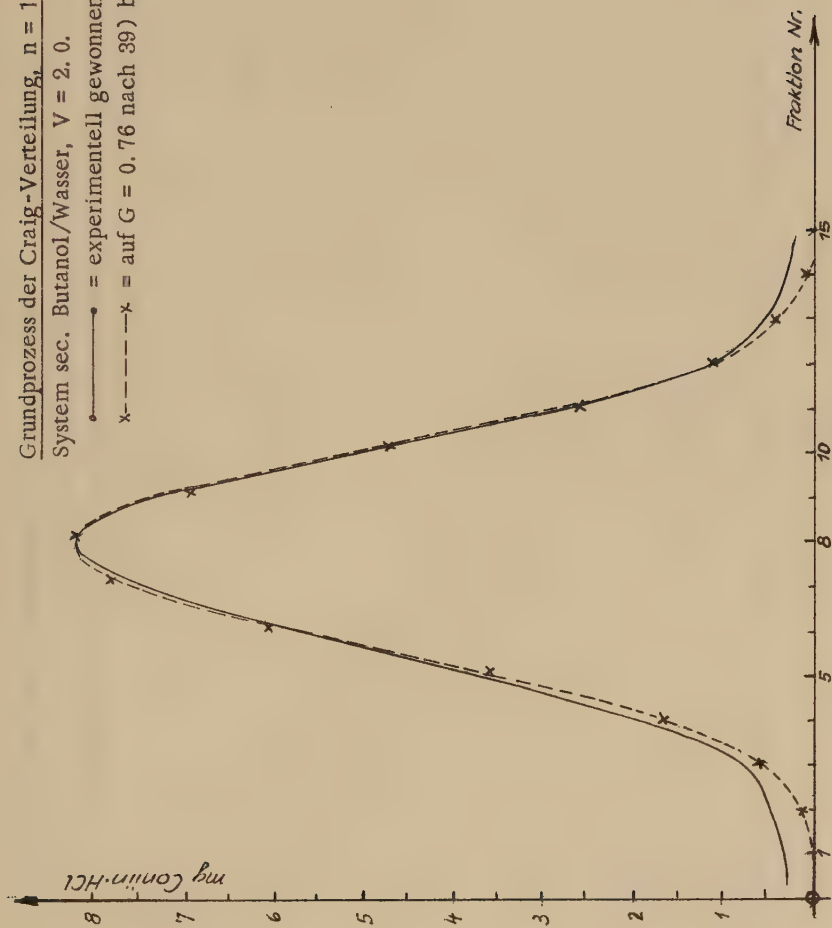


Abb. 11

- 1 = Flüchtigkeitskurve von 0,33 mg Coniin · HCl
(entspr. 0,10 ml n/50 HCl)
- 2 = Flüchtigkeitskurve von 2,0 mg Coniin · HCl
(entspr. 0,61 ml n/50 HCl)

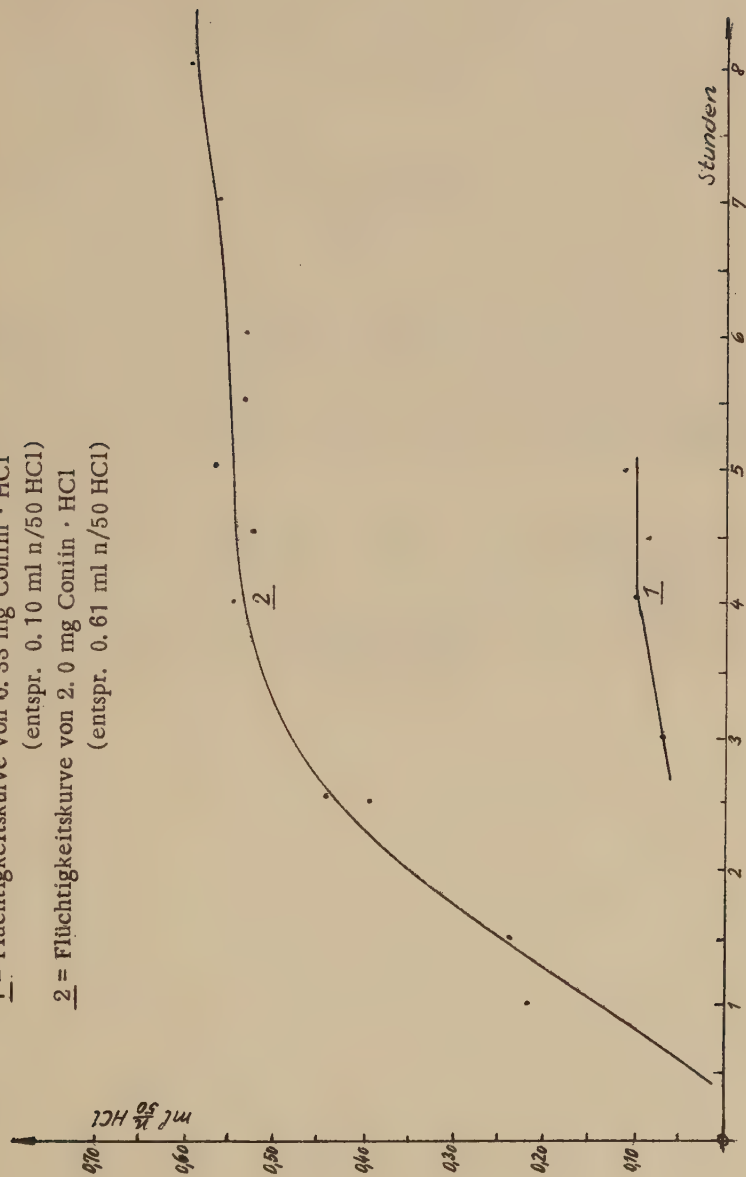


Abb. 12

Lebenslauf

Hans Günter Höss

Am 21. Juli 1931 wurde ich in Stuttgart als Sohn des Apothekers Dr. Ferdinand Höss und seiner Ehefrau Frieda, geb. Patt, geboren.

Meine Schulausbildung umfasste 4 Jahre Grundschule und 9 Jahre Reform-Real-Gymnasium in Stuttgart, wo ich im Juli 1951 die Reifeprüfung ablegte. Von Oktober 1951 bis Oktober 1953 arbeitete ich als Apothekerpraktikant in einer Stuttgarter Apotheke.

Nach bestandenem Vorexamen begann ich im Wintersemester 1953/54 das Studium der Pharmazie am Pharmazeutisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen (Leitung Prof. Dr. W. Hückel). Im Herbst 1956 legte ich dort das pharmazeutische Staatsexamen ab. Seitdem führte ich am Max-Planck-Institut für Biochemie in München meine Doktorarbeit aus.

